

# Herstellung, Charakterisierung und Einsatz von anti-Zona pellucida Protein 3 Peptidantiseren

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von	Susanne Charlotte Martha Pfisterer
aus	Stuttgart

Giessen 1999

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie  
Hautklinik  
Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: PD Dr. Hinsch  
Gutachter: Prof. Dr. Weidner

Tag der Disputation: 22.November 1999

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen

### 1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Spermatozoen-Eizell-Interaktion

1.2 Das Spermatozoon

1.2.1 Der Aufbau des Spermatozoons

1.2.2 Kapazitation und Akrosomreaktion

1.2.3 Spermatozoen Rezeptor

1.3 Die Eizelle

1.3.1 Der Aufbau der Eizelle

1.3.2 Zona pellucida

1.3.2.1 Zona pellucida Protein 1 (ZP1)

1.3.2.2 Zona pellucida Protein 2 (ZP2)

1.3.2.3 Zona pellucida Protein 3 (ZP3)

1.4 Zielstellung

### 2 Material und Methoden

2.1 Hersteller und Lieferfirmen

2.2 Chemikalien

2.3 Antikörper

2.4 Geräte

2.5 Versuchstiere

2.6 Peptide

2.6.1 Immunisierung und Gewinnung von Antiseren

2.6.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zur Titerbestimmung

2.7 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern

- 2.7.1** Affinitätschromatographische Reinigung von Immunglobulinen über immobilisierte synthetische Peptide
- 2.7.2** Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum mittels Säulenchromatographie an Protein A-Sepharose
- 2.8** Proteinbestimmung
- 2.9** Gewinnung von Ovarien und Eizellen
  - 2.9.1** Schweine Eizellen
  - 2.9.2** Maus Eizellen
  - 2.9.3** Humane Eizellen
- 2.10** Isolierung der Zona pellucida
  - 2.10.1** Mechanische Isolierung von Schweine und Maus Zona pellucida
  - 2.10.2** Isolierung von Maus Zona pellucida durch Percoll-Gradientenzentrifugation
- 2.11** Paraffinschnitte aus Ovarien
- 2.12** Humane Hemizonae pellucidae
- 2.13** Charakterisierung der Antiseren
  - 2.13.1** Immunhistochemie mit Paraffinschnitten
  - 2.13.2** Immunhistochemie an humanen Hemizonae
  - 2.13.3** Indirekter Immunfluoreszenztest an isolierten Eizellen
- 2.14** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
  - 2.14.1** Coomassie-Blau-Färbung
- 2.15** Immunoblot
  - 2.15.1** Western-Blot
- 2.16** Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen
- 2.17** Chemilumineszenzverfahren
- 2.18** Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Peptide**

#### **3.2 Antikörpernachweis mit Hilfe des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

##### **3.3.1 Reinigung und Konzentrierung der gewonnenen Antikörper über immobilisierte synthetische Peptide**

##### **3.3.2 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern über eine Protein A-Säule**

##### **3.3.3 Bestimmung der Titer über immobilisierte synthetische Peptide isolierte anti ZP3 Antikörper im ELISA**

##### **3.3.4 Bestimmung der Titer der über Protein A isolierten IgG Antikörper im ELISA**

#### **3.4 Antikörperreaktionen auf fixierten Ovargewebeschnitten**

##### **3.4.1 Antiserum AS ZP3-2**

##### **3.4.2 Antiserum AS ZP3-5**

##### **3.4.3 Antiserum AS ZP3-6**

##### **3.4.4 Kotrollexperimente**

#### **3.5.1 Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae**

#### **3.5.2 Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae nach Inkubation mit Spermatozoen**

#### **3.6 Indirekte Immunfluoreszenz**

##### **3.6.1 Antiserum AS ZP3-5**

##### **3.6.2 Antiserum AS ZP3-6**

##### **3.6.3 Negativkontrolle**

#### **3.7 Einsatz der Peptidantiseren im Immunoblot und Chemilumineszenzverfahren**

##### **3.7.1 Antiserum AS ZP3-5**

##### **3.7.2 Antiserum AS PO**

6

4        **Diskussion**

5        **Zusammenfassung**

6        **Literaturverzeichnis**

7        **Anhang**

## Abkürzungen

AS	Antiserum
BSA	Rinderserumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Erdbeschleunigung
HCG	Human chorionic gonadotropine
IgG	Immunglobulin G
KLH	Keyhole limpet haemocyanin
OD	Optische Dichte
OPD	O-Phenylendiamin Dihydrochlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropine
PVP	Polyvinylpyrrolidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylendiamin
TPBS	Tween-PBS
TRIS	Tetra-(hydroxymethyl) aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
ZP	Zona pellucida

## **1 Einleitung**

Internationale Untersuchungen haben ergeben, daß ungewollte Kinderlosigkeit häufig auf männliche Infertilität zurückzuführen ist. Sie erzeugt bei den betroffenen Patienten oft einen schwerwiegenden Leidensdruck. Aus diesem Grund hat die WHO die männliche Infertilität als eigenständige Krankheit bezeichnet, die auch als solche behandlungsbedürftig ist. Nach den Erhebungen der Volkszählung von 1988 sind in der Bundesrepublik etwa 1,4 Millionen Ehen kinderlos; mehr als 400 000 Paare aus dieser Gruppe müssen als ungewollt kinderlos bezeichnet werden. Wenn man weiter berücksichtigt, daß die Ursache hierfür in ca. 40% der Fälle beim Mann und in weiteren 20% bei beiden Partnern zu suchen ist, geht aus diesen Zahlen hervor, welche klinische Relevanz eine effektive andrologische und gynäkologische Abklärung mit einer sich daran anschließenden möglichst rationalen Therapie hat (Haidl, G. und Schill, W.- B., 1990).

Grundlagen für die Krankheitsbekämpfung bilden einerseits das Verstehen der physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, die zur Infertilität führen, und andererseits die damit verbundene exakte kausale Diagnostik.

### **1.1 Grundlagen der Spermatozoen-Eizell-Interaktion**

Im Jahre 1875 beschrieb der deutsche Anatom und Biologe Oskar Hertwig zum ersten Mal das Verschmelzen des männlichen und weiblichen Kerns in der Eizelle. Seit diesem Zeitpunkt kristallisierten sich immer mehr weitere Schritte des kompletten Befruchtungsvorgangs heraus.

Die ersten Untersuchungen wurden vor allem an wirbellose Meerestieren wie am Seeigel und an Seesternen vorgenommen. Die Eier dieser Spezies werden außerhalb des weiblichen Organismus im Seewasser befruchtet; somit waren die Voraussetzungen zur Beobachtung der Spermatozoen- Eizell- Interaktion im Labor relativ leicht durchzuführen.



Seit den späten fünfziger Jahren wurden Testmodelle mit Gameten von Säugetieren entwickelt und verbessert, die eine *in vitro* Befruchtung und somit eingehende Untersuchungen der Interaktion zwischen Spermatozoon und Eizelle ermöglichten. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft läuft der Besamungsvorgang wie auf nachfolgender Skizze dargestellt ab.

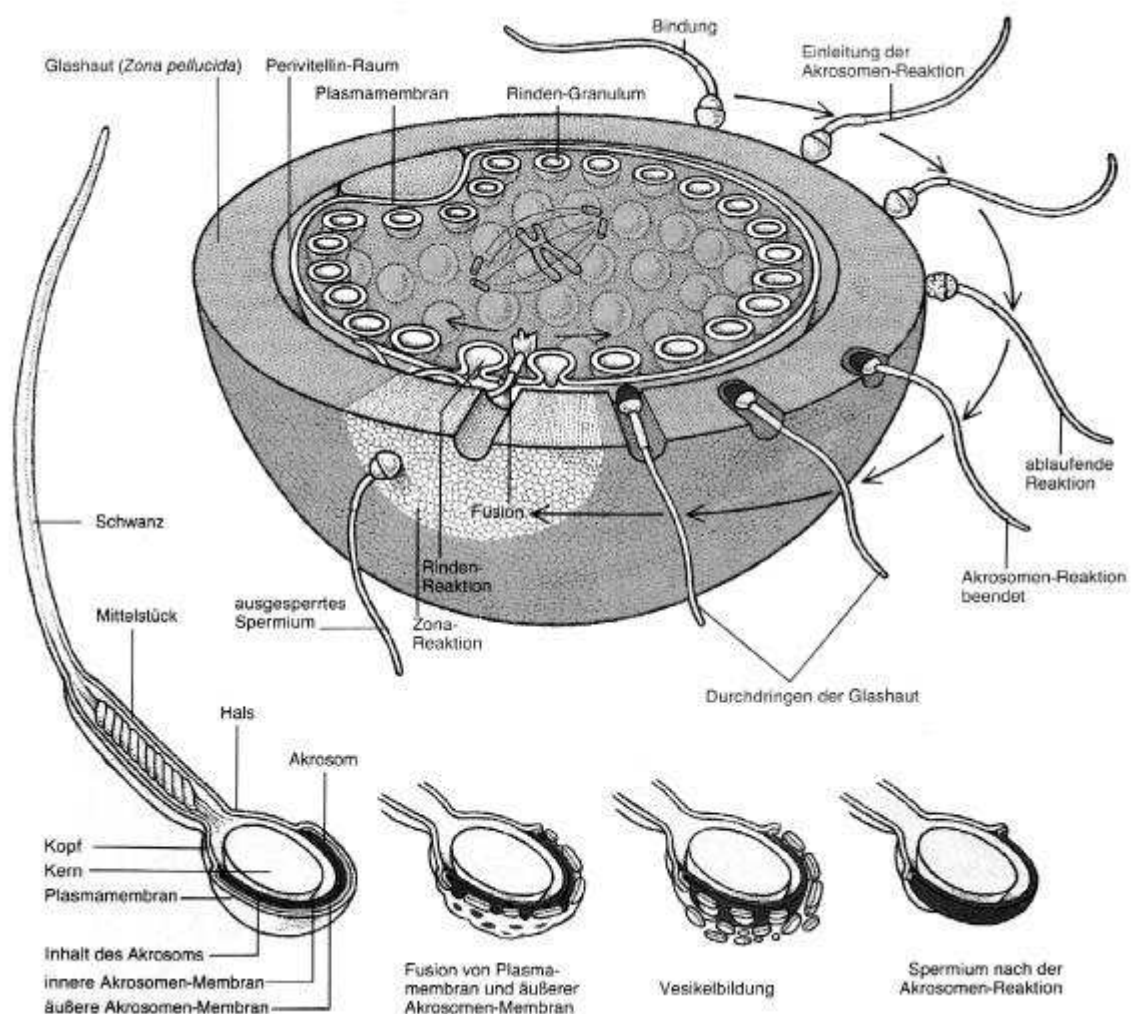


Abb.1. Die einzelnen Schritte des Besamungsvorgangs (Spektrum der Wissenschaft 2.1989)

Nach Erreichen der Eizelle heften sich die Spermatozoen zunächst locker (Anheftung), dann relativ fest (Bindung) an die Glashaut (Zona pellucida; nach lateinisch pellucida, durchscheinend) der Eizelle, die die äußere Schutzhülle bildet. Das Spermatozoon interagiert in der Regel nur mit der Eizelle der gleichen Spezies und gewährleistet somit die Speziespezifität des Befruchtungsvorganges (Yanagimachi, 1994). Nachdem ein Spermium an die Zona pellucida gebunden hat, läuft die Akrosomreaktion ab (Saling et al., 1979; Bleil und Wassarman, 1980a). Das Akrosom (nach griechisch akron, Spitze) kann man als ein großes Lysosom bezeichnen und liegt im vorderen Abschnitt des Spermienkopfes, direkt unter der umhüllenden Plasmamembran; es ist reich an proteolytischen Enzymen. Während der Akrosomreaktion verschmilzt die Plasmamembran des Spermatozoons mit der äußeren akrosomalen Membran und bildet kleine Vesikel, die im weiteren Verlauf abgestreift werden. Durch diesen Vorgang werden die im Akrosom enthaltenen Enzyme freigesetzt, die dem Spermatozoon das Durchdringen (Penetration) der Zona pellucida ermöglichen (Propping et al., 1978).

Das Spermatozoon kann dann den perivitellinen Raum erreichen und wahrscheinlich über Integrine (Blobel et al., 1992; Myles et al., 1994), die an der Umschlagfalte am Äquatorialesegment lokalisiert sind, mit der Plasmamembran der Eizelle (Oolemm) verschmelzen (Fusion) (Fusi et al., 1992, 1993). Die Verschmelzung beider Gameten löst eine Reihe von biochemischen Reaktionen aus, die die Penetration und Fusion weiterer Spermatozoen verhindern und somit einen Schutz vor Mehrfachbefruchtung darstellen (Ducibella, 1991; Yanagimachi, 1994). Durch einen noch nicht geklärten Mechanismus wird das Oolemm innerhalb weniger Minuten (Sato, 1979; Stewart-Savage und Bavister, 1991) biochemisch so modifiziert, daß keine weiteren Spermatozoen binden können (Barros und Yanagimachi 1972; Wolf, 1978). Weiterhin wird durch die Reaktion der kortikalen Granula ein Spermatozoenblock induziert. Dabei findet eine Verschmelzung der mit proteolytischen Enzymen ausgestatteten kortikalen Granula mit der Plasmembran der Eizelle statt. Durch diesen sehr wahrscheinlich über einen  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen Influx vermittelten exozytotischen Prozeß wird der Inhalt der Granula nach außen abgegeben. Von der Bindungsstelle des Spermatozoons an das Oolemm setzt sich dieser Vorgang nach allen Seiten hin weiter fort. Durch diese

biochemische Veränderung der Zona pellucida (Zona Reaktion) wird sie "gehärtet" (Hardening) und für weitere Spermatozoen undurchdringlich (Barros und Yanagimachi, 1971). Eine Depolarisierung des Oolemmes, die bei Seeigeln eine Mehrfachbefruchtung verhindert, konnte im Säugermodell, z.B. der Maus, nicht nachgewiesen werden (Jaffe et al., 1983). Nach der Fusion des besamenden Spermatozoons befinden sich Kopf und Schwanz im Ooplasma der Eizelle und führt zur ihrer Aktivierung. Darunter versteht man die Exozytose der kortikalen Granula, die Vollendung der Meiose, die Bildung des weiblichen Vorkerns und die DNA-Synthese in den Vorkernen als Grundlage für die Verschmelzung der Vorkerne (Befruchtung) (Yanagimachi, 1994). Der Vorgang der Spermatozoen induzierten Eizellaktivierung wird von G-Proteinen gesteuert (Moore et al., 1993). Es handelt sich hier um Guaninnukleotid bindende Regulatorproteinen, die als Signaltransduktionsmoleküle ubiquitär in Zellen vorkommen.

## **1.2 Das Spermatozoon**

### **1.2.1 Der Aufbau des Spermatozoons**

Das Spermatozoon wird in einen Kopf-, Mittelstück- und Schwanzbereich aufgegliedert. Ein großer Anteil wird vom Kopf gebildet, der z.B. beim Menschen eine Länge von etwa 5,5µm und eine Breite von etwa 3µm hat (Stevens, 1990). Im Kopf sind der Zellkern und das Akrosom lokalisiert, welches von einer äußeren und inneren akrosomalen Membran umschlossen wird. Das Akrosom kann als ein großes Lysosom (Allison und Hartree, 1970) betrachtet werden. In ihm sind proteolytische Enzyme wie Akrosin, Hyaluronidase, Esterasen und ähnliche Substanzen (Eddy und O'Brien, 1994) enthalten, die das Durchdringen des Spermatozoons durch die Zona pellucida ermöglichen. Der Spermatozookopf unterschiedlicher Spezies zeigt verschiedene Formen; beim Menschen besitzt er die Form eines Rotationsellipsoids, beim Rind ist er abgeflacht (Rüsse und Sinowatz, 1991), bei Maus und Ratte hakenförmig (Yanagimachi, 1981).

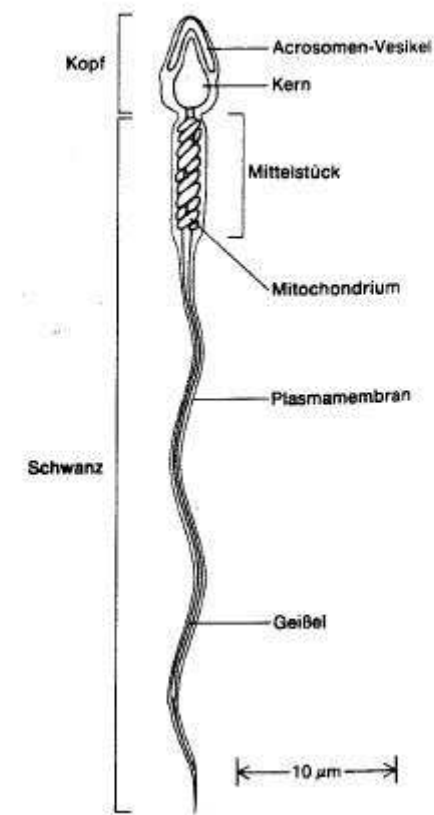


Abb.2: Schematische Darstellung eines Spermatozoons

Der Schwanz des Spermatozoons dient der aktiven Bewegung und hat beim Menschen eine Länge von etwa 55µm, beim Rind etwa 63µm (Rüsse und Sinowatz, 1991), bei Maus und Ratte von über 100µm (Eddy und O'Brien, 1994). Er ist in vier Teilabschnitte (Spermienhals, Mittelstück, Hauptstück und Endstück) gegliedert und hat ein zentrales, mikrotubuläres Axonem mit umgebenden Mantelfasern (outer dense fibers) (Pedersen, 1972; Irons und Clermont, 1982; Henkel et al., 1992). Das Mittelstück stellt mit seinem zytoplasmatischen mitochondrialen Apparat den Energielieferanten dar (Phillips, 1977).

### 1.2.2 Kapazitation und Akrosomreaktion

Frisch ejakulierte, motile Spermatozoen sind noch nicht in der Lage, an die Zona pellucida zu binden und eine Eizelle zu befruchten. Zunächst müssen sie einen Reifungsprozeß, die sogenannte Kapazitation, durchlaufen; dieser Prozeß wurde erstmals von Austin (1951, 1967) und Chang (1951, 1955) experimentell belegt. Die Kapazitation findet in vivo im weiblichen Genitaltrakt statt und konnte auch in vitro erreicht werden (Yanagimachi, 1994). Der Zeitraum bis zur Vollendung der Kapazitation zeigt je nach Spezies deutliche Unterschiede. Bei Maus-, Katzen- und menschlichen Spermatozoen beträgt sie etwa eine Stunde, bei Kaninchen- oder Rinderspermatozoen mehrere Stunden (Yanagimachi, 1994; Kanitz, 1994). Der noch nicht vollständig geklärte Kapazitationsprozeß führt zu vielen Veränderungen im Spermatozoon (Holt, 1995; Moore, 1995; Harrison und Gadella, 1995). So konnte Yanagimachi (1970) zeigen, daß das zunächst lineare Bewegungsmuster bei Goldhamsterspermatozoen in ein sinusoidales (hyperaktives) Muster übergeht. Veränderte Ionenverhältnisse ( $\text{Ca}^{++}$ -Influx) führen zu einer Depolarisierung der Spermatozoenmembran (Fraser, 1995; Florman et al., 1995). Nach Veränderungen im Bereich der extrazellulären Glykoproteinhülle der Plasmamembran des Spermatozoonkopfes können histochemisch und ultrastrukturell Veränderungen nachgewiesen werden (Weinman und Williams, 1961; Piko, 1967). In dieser Hülle sind Proteinase hemmende Proteine (Boettger-Tong et al., 1992), Akrosom-stabilisierende Proteine epididymalen Ursprungs (Oliphant et al., 1985; Thomas et al., 1986) sowie Glykoproteine, die als Dekapazitationsfaktoren bezeichnet werden (Aonuma et al., 1973; Reddy et al., 1979), beschrieben worden.

Die Akrosomreaktion ist der Endpunkt dieses obligatorischen Reifungsprozesses des Spermatozoons; als Konsequenz kommt es zur Durchdringung der Zona pellucida und zur Fusion der Gameten (Yanagimachi, 1988). Kapazitierte Spermatozoen binden mit einem in der Plasmamembran bisher noch nicht eindeutig identifizierter Molekül über einen noch nicht genau bekannten Kohlenhydraterkennungsmechanismus an definierte Oligosaccharidstrukturen der Zona pellucida. Mori et al. (1993) wiesen nach, daß in Gegenwart von D-Mannose und D-Fructose die Spermatozoenpenetration komplett verhindert

wird. Sie vermuteten, daß D-Mannose der Zona pellucida an einen entsprechenden plasmamembranständigen Rezeptor des Spermatozoons bindet, D-Fructose dagegen als stabilisierender Faktor bei der Akrosomreaktion fungiert. Die akrosomale Exozytose und die damit verbundene Freisetzung proteolytischer Enzyme wird nach Anlagerung des Spermatozoons an die Zona pellucida induziert (Saling et al., 1979; Bleil und Wassarman, 1980a). Dieser Vorgang ist in der Regel speziesspezifisch, jedoch kann z.B. solubilisierete Zona pellucida der Maus die Akrosomreaktion in menschlichen Spermatozoen auslösen (Lee et al., 1987). Die durch die Zona pellucida ausgelöste Akrosomreaktion wird durch eine GTP-bindende Protein regulierte Signaltransduktionskette gesteuert (Kopf et al., 1986; Endo et al., 1987; Karnik et al., 1992; Lee et al., 1992; Ward et al., 1994).

Für die sekundäre, feste Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida wird das im Akrosom enthaltene Akrosin/Proakrosin verantwortlich gemacht (Urch, 1991); mittels des Akrosins und weiteren proteolytischen Enzymen kann das Spermatozoon die Zona pellucida durchdringen (Morales und Llanos, 1995). Dadurch bildet sich ein feiner Penetrationskanal (Yanagimachi, 1994).

Durch verschiedene chemische Substanzen wie Calcium-Ionophor, Lysolecithin und Progesteron kann die akrosomale Reaktion ausgelöst werden; Voraussetzung ist jedoch immer eine stattgefundene Kapazitation (Talbot et al., 1976; Ohzu und Yanagimachi, 1982; Yanagimachi, 1994).

Einen wesentlichen Anteil an der klinischen Diagnostik hat die funktionelle Spermadiagnostik, bei der insbesondere akrosomale Funktionstests, Akrosinbestimmungen und die Akrosomreaktion erfaßt werden. Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion ist ein wesentlicher Parameter zur Erfassung der Befruchtungsfähigkeit einer Spermatozoenpopulation. Der Verlauf der akrosomalen Reaktion kann zytochemisch (Triple-Stain-Technik) durch transmissionselektronenmikroskopische Studien, durch die Verwendung von Antikörpern gegen akrosomale Antigene oder durch fluoreszierende Lektine erfaßt werden. Dabei sind morphologisch und funktionell deutliche Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Männern zu beobachten.

### 1.2.3 Spermatozoen Rezeptor

Im Mausmodell wird für die Spermatozoon-Eizell Bindung und Induktion der akrosomalen Reaktion auf der Seite der Zona pellucida das ZP3-Protein (Bleil und Wassarman, 1983), auf der Seite der Spermatozoenmembran ein 95 kDa Protein verantwortlich gemacht (Saling, 1991; Leyton et al., 1992), welches auch beim Menschen identifiziert werden konnte (Burks et al., 1995). Leyton und Saling (1989) berichteten, daß bei der Maus das 95 kDa Spermatozoenprotein gereinigtes Maus Zona pellucida 3 Protein bindet und daß dieses 95 kDa Protein nach Bindung an ZP3 als Tyrosinkinasesubstrat dient. Diese Ergebnisse werden zur Zeit kontrovers diskutiert, denn Kalab et al. (1994) identifizierten ein akrosomales 95 kDa Spermatozoon Plasmamembranprotein der Maus als HKI (Hexokinase Typ I aus dem Gehirn von Ratten). Allerdings reagierte das menschliche 95 kDa Spermatozoen Protein nicht mit Hexokinase-Antikörpern, dafür jedoch mit Antikörpern gegen Phosphotyrosin. Das Antigen ist in der akrosomalen Region des menschlichen Spermatozoons lokalisiert (Burks et al., 1995). Die Tyrosinphosphorylierung im Spermatozoon ist ein wichtiger Fertilisierungsschritt. Blockierung der Proteinkinaseaktivität verhindert die Akrosomreaktion und damit die Fertilisierung (Leyton et al., 1992). Das 95 kDa Protein stellt bei Mensch (Yanagimachi, 1994) und Maus (Leyton et Saling, 1989) das Protein mit dem höchsten Phosphotyrosingehalt dar. Peterson et al. (1991) identifizierten in Membranen von Schweinespermatozoen ein integrales Plasmamembranprotein (APZ), an das Zona pellucida Proteine des Schweines binden. Die apparente Molekularmasse des Proteins liegt bei etwa 42 kDa.

Bleil und Wassarman (1990) konnten mit Hilfe von Photoaffinitätsexperimenten nachweisen, daß bei der Maus das Zona pellucida 3 Protein an ein 56 kDa Protein im Akrosom des Mausspermatozoons bindet. Dieses Protein ist nur in den Spermatozoenköpfen lokalisiert, und eine Bindung von ZP3 Protein findet nur bei Spermatozoen statt, in denen noch keine Akrosomreaktion abgelaufen ist. Cheng et al. (1995) bestätigen diese Ergebnisse mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen. Sie isolierten ein 56 kDa Spermatozoenoberflächenprotein bei der Maus, sp56. Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität für das Zona pellucida 3 Protein der Maus und wird für die Spermatozoen-

Eizellerkennung verantwortlich gemacht. Das 56 kDa Protein ist in der Maus für die Spezies-Spezifität der Spermatozoon-Eizellbindung verantwortlich. Die Präsenz dieses Proteins im Spermatozoon der Maus entscheidet über die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida der Maus (Bookbinder et al., 1995). Allerdings besitzen auch andere Substanzen des Mausspermatozoons, wie Galactosyltransferase, Mannosidase, Sialyltransferase (Yanagimachi, 1994) oder Proteine mit Phosphotyrosinresten (Naz, 1995) eine hohe Bindungskapazität für Zona pellucida 3 Protein.

Die Arbeitsgruppe um Dostalova et al. (1995) untersuchten die Funktion der Spermatozoen-adhäsine AWN und AQN des Schweines. Diese befinden sich in den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und auf epididymalen, ejakulierten sowie kapazitierten Spermatozoen. Sie vermuten, daß einige Subtypen dieser Adhäsine für die Kapazitation wie auch für die Erkennung und Bindung der Gameten verantwortlich sind.

Zusammenfassend muß jedoch festgestellt werden, daß insbesondere speziesspezifische Unterschiede die Erstellung eines einheitlichen Konzepts der Spermatozoon Zona pellucida Interaktion erheblich erschweren.

### **1.3 Die Eizelle**

#### **1.3.1 Der Aufbau der Eizelle**

Die Eizelle ist eine kugelförmige und zytoplasmareiche Zelle. Während der Ovulation hat die menschliche Eizelle einen Durchmesser von 120-150 µm (Bucher und Wartenberg, 1989).

Die Oozyten von Rind und Schwein haben einen etwa gleichgroßen Durchmesser (Kanitz, 1994), der der Mauseizelle beträgt 80 µm (Eppig, 1991).

Im Ooplasma befinden sich der Zellkern, die Zellorganellen wie Ribosomen, Mitochondrien und der Golgi-Apparat, sowie die kortikalen Granula. Der Abstand der kortikalen Granula von der Plasmamembran beträgt etwa 2 µm (Ducibella, 1991). Kurze Zeit vor der Ovulation ist die erste Reifeteilung der Eizelle abgeschlossen, das Polkörperchen ist entstanden. Die



zweite Reifeteilung findet während der Ovulation statt, bis zur Befruchtung der Eizelle mit der Samenzelle verbleibt sie in der Metaphase (Moore, 1985).

Die Eizelle wird von der Zona pellucida umgeben und von ihr durch den perivitellinen Spalt getrennt. Die Zona pellucida stellt zum einen ein Hindernis für die Befruchtung dar, zum anderen aber ein kompliziertes biologisches Schutz- und Sicherungssystem (Nichols und Gardner, 1989): sie trägt zur Speziespezifität bei der Befruchtung bei und schützt die Eizelle vor Mehrfachbefruchtung (Wassarman und Albertini, 1994).

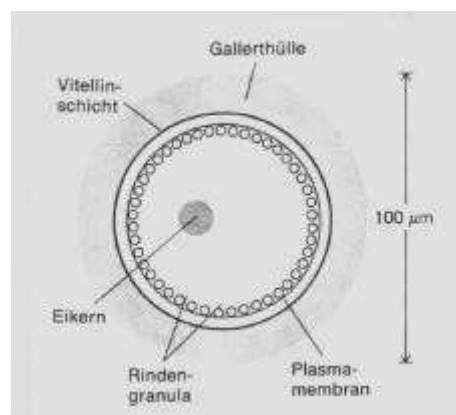


Abb.3: Schematische Darstellung einer Eizelle

### 1.3.2 Zona pellucida

Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre, relativ dicke, durchscheinende Glykoprotein-Hülle, die die Eizellen der Säugetiere umgibt. Sie umhüllt Oolemm der Eizelle und separiert die Eizelle von den umgebenden Follikel- und Kumuluszellen (Yanagimachi, 1994). Ein Kontakt der Oocyte über Mikrovilli zu Ausläufern der Kumuluszellen wird hinsichtlich interzellulärer Kommunikation diskutiert (Wassarman und Albertini, 1994). Die Dicke der Zona pellucida variiert je nach Spezies zwischen 2 µm und 30 µm. Bei der Maus hat sie eine Dicke von 5 µm, 13 µm beim Menschen, 16 µm beim Schwein und beim Rind bis zu 27 µm (Dunbar, 1983; Dunbar et al., 1991). Die Zona pellucida stellt ein loses Maschenwerk von Fibrillen dar, das

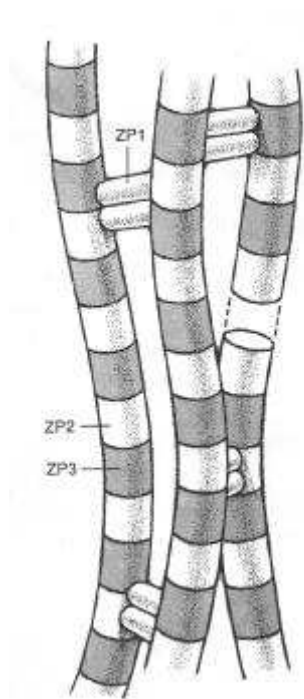
eine Barriere für Spermatozoen bildet, aber für Immunglobulin und andere große Makromoleküle durchgängig ist (Wassarman, 1988). In früheren Untersuchungen galt die Struktur der Zona pellucida als relativ homogen (Guraya, 1974; Dumont und Brummett, 1985). Morphologische Untersuchungen, wie zum Beispiel die Elektronenmikroskopie oder immunhistologische Studien, zeigten jedoch, daß die Zona pellucida nicht einheitlich aufgebaut ist, sondern unterschiedliche Schichten besitzt (Dunbar et al., 1994). Die äußere Oberfläche beim Goldhamster beispielsweise zeigt ein gefenstertes Muster, während die innere Schicht morphologisch dicht erscheint (Phillips und Shalgi, 1980).

Kontroverse Meinungen bestehen bezüglich des Synthesortes der Zona pellucida Proteine. Früheren morphologischen und histochemischen Untersuchungen zufolge soll die Zona pellucida einiger untersuchter Spezies von den Follikelzellen gebildet werden (Guraya, 1974). Allerdings zeigten neuere biochemische, immunologische und gentechnologische Untersuchungen, daß diese Glykoproteine, zumindest im Mausmodell, ausschließlich von der Eizelle gebildet werden (Flechon et al., 1984; Wassarman, 1987 b, 1988; Dietl, 1989). Dunbar et al. (1994) wiesen nach, daß beim Kaninchen auch von Granulosazellen Zona pellucida Proteine gebildet werden.

Die Zona pellucida besteht je nach Spezies aus zwei bis vier Glykoproteinen unterschiedlicher Molekularmassen. Bei Maus, Hamster, Ratte, Kaninchen und Mensch wurden drei Glykoproteine nachgewiesen (Maresh und Dunbar, 1987; Shabanowitz und O'Rand, 1988; Araki et al., 1992; Miller et al., 1992), während bei der Katze nur zwei, bei Schwein (Koyama et al., 1991) und Rind (Bercegeay et al., 1993) vier Glykoproteinklassen diskutiert werden. Die beschriebenen Glykoproteinklassen der Zona pellucida basieren auf ihren biochemischen Eigenschaften oder werden durch immunologische Marker definiert. Harris und Mitarbeiter (1994) unterteilten aufgrund gentechnologischer Erkenntnisse die Zona pellucida in ZPA (ZP2), ZPB (ZP1) und ZPC (ZP3) Proteine. Die Subklassen unterscheiden sich in der Länge der cDNA, wobei ZPA die größte und ZPC die kleinste Länge der cDNA aufweist.

Die Maus Zona pellucida, das am besten untersuchte Modell, besteht aus drei Glykoproteinen, die als Zona pellucida Protein 1 (ZP1, ZPB), Zona pellucida Protein 2 (ZP2, ZPA) und Zona pellucida Protein 3 (ZP3, ZPC) bezeichnet werden. Der Grundbaustein der Maus Zona

pellucida stellt eine aus 15 nm großen ZP2-ZP3 Hetero-Dimeren zusammengesetzte Einheit dar, die mehrere hundert Mal linear aneinandergereiht ist. Diese fädigen Strukturen werden durch ZP1 Moleküle, die aus zwei identischen durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten bestehen, verbunden (Greve und Wassarman, 1985). ZP1, ZP2 und ZP3 besitzen dabei ein molares Verhältnis zueinander von 1:10:10 (Bleil und Wassarman, 1980b; Shimizu et al., 1983; Wassarman, 1988).



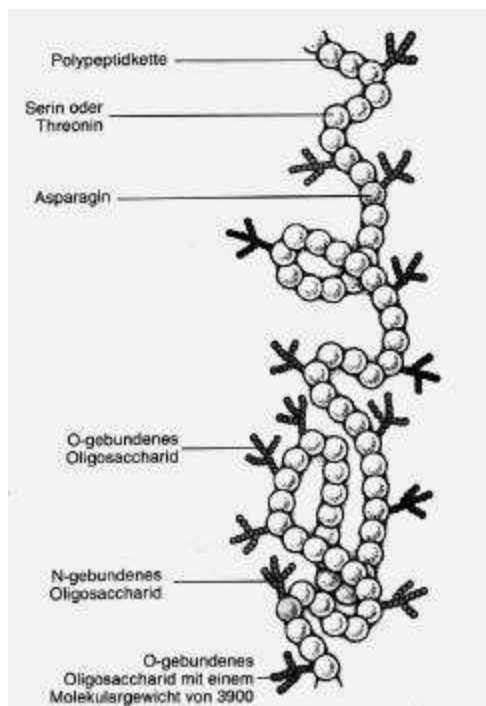
Das als ZP3 bezeichnete Molekül ist eine Hauptkomponente der Filamente, die sich zur Zona pellucida zusammenlagern. Es handelt sich bei ihm um ein Glykoprotein, ein Polypeptid mit Zuckerseitenketten. Vereint mit einem anderen Glykoprotein ZP2, bildet es die sich wiederholenden Grundbausteine der Filamente. Ein weiteres Glykoprotein, ZP1, verknüpft die Fadenmoleküle (nach Wassarman, 1989).

Abb. 4

Die Molekularmassen der drei Glykoproteine der Maus Zona pellucida sind aufgrund abweichender post-translationaler Glykosylierung und Sulfidierung heterogen und liegen unter nicht reduzierten Bedingungen bei 185-200 kDa (ZP1), 120-140 kDa (ZP2) und 83 kDa (ZP3) (Epifano und Dean, 1994).

An der Polypeptidkette der ZP Proteine sitzen in Form kleiner Seitenäste zahlreiche kurze Ketten einfacher Zucker, sogenannte Oligosaccharide. Drei oder vier davon sind N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide, d.h. sie sind an einem Stickstoffatom der Aminosäure

Asparagin kovalent gebunden. Eine relativ große Zahl von den Oligosacchariden ist O-glykosidisch gebunden, d.h. über ein Sauerstoffatom der Aminosäuren Serin oder Threonin. Die Oligosaccharide kommen in vielen Varianten vor. ZP3-Moleküle haben z.B. je nach Spezies unterschiedliche Sequenzen von Zuckerketten (Bleil und Wassarman, 1980b,c; Greve et al., 1982; Roller und Wassarman, 1983; Florman und Wassarman, 1985; Philpott et al., 1987).



Im Mausmodell ist ZP3 das Rezeptormolekül, das die Spermien bindet. Es wird auch für die Induktion der Akrosomreaktion verantwortlich gemacht. Für die Spermienbindung sind die vom Polypeptidrückgrad abgehenden Zuckerketten wesentlich: die O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide mit einem Molekulargewicht von etwa 3900 (sie sind an einem Sauerstoffatom der Aminosäure Serin und Threonin gebunden). Diese Zuckerketten sollen auch, zusammen mit der Polypeptidkette von ZP3, bei der Induktion der Akrosomreaktion von Bedeutung sein (nach Wassarman, 1989 ).

Abb. 5

### 1.3.2.1 Zona pellucida Protein 1 (ZP1)

Das Zona pellucida Protein 1 verknüpft die ZP2-ZP3 Filamente miteinander und formt bzw. stabilisiert somit die Zona pellucida Matrix (Greve und Wassarman, 1985). Das ZP1 liegt in

der Zona pellucida als ein über Disulfidbrücken verknüpftes Homodimer vor. Im Mausmodell beträgt die Molekularmasse eines Monomers 130 kDa (Bleil und Wassarman, 1980 b).

In mehreren Spezies konnten Harris et al. (1994) das entsprechende Gen identifizieren. Dabei zeigten sich über 69 % Übereinstimmungen der DNA-Sequenzen. Beim Menschen besteht das Gen aus 12 Exons mit einer Größe von 79-190 bp, unterteilt von 11 Introns, die eine Länge von 83-3500 bp besitzen. Die Homologie der Aminosäuresequenzen liegt zwischen 60-68 %. Das menschliche ZP1 besteht aus 540 Aminosäuren.

### **1.3.2.2 Zona pellucida Protein 2 (ZP2)**

Das Zona pellucida Protein 2 wird, zumindest im Mausmodell, als sekundärer Rezeptor bei der Spermatozoenbindung bezeichnet (Bleil und Wassarman, 1986; Bleil et al., 1988). ZP2 bindet an die innere akrosomale Membran bereits akrosomreagierter Spermatozoen (Mortillo und Wassarman, 1991). Bleil und Wassarman (1986) konnten zeigen, daß ein gegen ZP2 gerichteter monoklonaler Antikörper die sekundäre Spermatozoenbindung über die innere Akrosomenmembran im Mausmodell verhinderte, die primäre Spermatozoenbindung jedoch nicht beeinflußt wurde. Weiterhin wurde durch diesen Antikörper die Bindung von solubilisierten, radioaktiv markiertem ZP2 an die innere akrosomale Membran akrosomreagierter Spermatozoen herabgesetzt. Da durch Trypsin Inhibitoren eine Blockierung der sekundären, nicht aber der primären Bindung möglich war, folgte Bleil (1988), daß es sich bei der sekundären Spermatozoenbindung um den ersten und ZP3 unabhängigen Schritt der Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida handelt. Als Ligand für ZP2 auf der Seite des Spermatozoons wird Akrosin/Proakrosin angenommen. Diese Trypsin ähnliche Protease wurde auf der inneren und äußeren akrosomalen Membran nachgewiesen und soll ZP2 als endogenes Substrat besitzen (Töpfer-Petersen et al., 1995; Urch, 1991). Lo-Leggio et al. (1994) wiesen nach, daß Zona pellucida Proteine des Schweines einen entscheidenden Einfluß auf den Umwandlungsprozeß von Proakrosin zu  $\beta$ -Akrosin ausüben. Der genaue molekulare Vorgang der sekundären Spermatozoen-Eizell Bindung ist

noch nicht bekannt. Eine wichtige Rolle bei der Bindung von ZP2 an Lektin (Tulsiani et al., 1992) werden hierbei hochmolekularen Mannose/Hybrid Oligosaccharidketten zugeschrieben. Weiterhin spielt ZP2 durch das sog. "Zona hardening" eine Rolle bei der Verhinderung einer Polyspermie (Wassarman, 1992). Im Mausmodell wird nach dem Auslösen der Reaktion der kortikalen Granula eine 21-34 kDa große Proteinase in den perivitellinen Spalt und die Zona pellucida mittels Exozytose freigegeben. Dieses Enzym wird als ZP2 Proteinase bezeichnet und führt zu einer Veränderung des ZP2-Moleküls (Moller und Wassarman, 1989) und wird nun als ZP2<sub>f</sub> bezeichnet. Die Molekularmasse des ZP2 Proteins beträgt 120 kDa, die des partiell hydrolysierten ZP2<sub>f</sub> 90 kDa (Bleil et al., 1981). Dieses ist über Disulfidbrücken mit einem 23 kDa großen Spaltprodukt verbunden und in der Zona pellucida verankert. Sobald mehr als 16 % aller ZP2-Moleküle proteolytisch umgebaut sind, verhärtet sich die Zona pellucida und keine weiteren Spermatozoen können sie durchdringen. Die ZP2-ZP2<sub>f</sub>-Konversion ist Acetylcholin abhängig und induzierbar und wird über ein Pertussis-Toxin insensitive G-Protein moduliert (Williams et al., 1992). Nach Verhärtung der Zona pellucida der Maus können nur noch etwa 15% der Spermatozoen das Netzwerk penetrieren (Choi et al., 1987); desweiteren wurde nachgewiesen, daß dadurch die Zona widerstandsfähiger gegenüber enzymatischen und chemischen Substanzen wie Trypsin, Pronase, Mercaptoethanol (Gwatkin, 1977) und Chymotrypsin (De Felici und Siracusa, 1982) wird. Downs et al. (1986) konnten zeigen, daß fetales Kälberserum die Umwandlung von ZP2 in ZP2<sub>f</sub> während der Reifung von Mausoozyten in vitro hemmt, wobei hauptsächlich Fetuin eine wichtige Rolle spielen soll (Schroeder et al., 1990).

Das ZP2 Gen von Maus und Mensch ist inzwischen kloniert und sequenziert, so daß auch hier die Primärstrukturen zur Verfügung stehen (Liang et al., 1990; Liang und Dean, 1993). Auch die Sequenzen weiterer Spezies (z.B. Mensch und Kaninchen) sind inzwischen bekannt (Harris et al., 1994). Dabei findet sich eine Übereinstimmung in den cDNA-Sequenzen bei etwa 69 bis 89 %. Die Homologie in den Aminosäuresequenzen liegt bei 54-83 %. Die ZP2-Moleküle bestehen aus 676-745 Aminosäuren, wobei das menschliche ZP2 Protein die längste Aminosäuresequenz aufweist (Harris et al., 1994). Das menschliche ZP2-Gen besteht aus 19 Exons mit einer Länge von 45-190 bp und 18 Introns mit 74-3000 bp. Es soll beim Menschen

auf dem Chromosom Nr. 16 (Epifano und Dean, 1994), bei der Maus auf dem Chromosom Nr. 7 (Lunsford et al., 1990) lokalisiert sein.

### **1.3.2.3 Zona pellucida Protein 3 (ZP3)**

Das ZP3-Glykoprotein spielt bei der Maus eine zentrale Rolle für die primäre speziesspezifische Bindung des Spermatozoons an die Eizelle und für die Induktion der Akrosomreaktion. Über einen O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharid des ZP3-Proteins wird die primäre Bindung und Erkennung beider Gameten vermittelt. Das Oligosaccharid hat eine Molekularmasse von 3 900 Da (Florman und Wassarman, 1985) und verfügt über mindestens einen terminal  $\alpha$ -gebundenen Galactoserest (Bleil und Wassarman, 1988). Für die Spermatozoenrezeptorfunktion des ZP3 sind ausschließlich die Karbohydratanteile verantwortlich, für die Induktion der akrosomalen Reaktion die Polypeptidketten des ZP3 Proteins (Florman et al., 1984; Florman und Wassarman, 1985). Es konnte in vivo gezeigt werden, daß die Immunisierung mit einem synthetischen Peptid aus der Aminosäuresequenz des Maus ZP3-Proteins bei weiblichen Mäusen zu einer langanhaltenden Kontrazeption führte (Millar et al., 1989). Bleil und Wassarman konnten bereits 1980 am Mausmodell zeigen, daß mit isoliertem ZP3 Protein zuvor inkubierte Spermatozoen nicht mehr an eine Eizelle binden konnten (Bleil und Wassarman, 1980a). Radioaktiv markiertes ZP3 bindet an die Plasmamembran nicht akrosomreagerter Spermatozoen, jedoch nicht an solche, die bereits die Akrosomreaktion durchlaufen haben (Bleil und Wassarman, 1986). Etwa 10 000-50 000 solcher Bindungsstellen konnten im Bereich der Plasmamembran des Spermatozoenkopfes nachgewiesen werden (Bleil und Wassarman, 1986). Die Bedeutung von ZP3 für die Interaktion mit der Zona pellucida ist außerdem mit Hilfe transgener Mäuse untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, daß Oozyten von transgenen Mäusen, die in ihrem Genom das ZP3-Gen des Hamsters tragen, in der Lage waren, Hamsterspermatozoen zu binden (Kinloch et al., 1992).

Eine weitere wichtige Funktion des ZP3-Proteins besteht in der Induktion der Akrosomreaktion gebundener Spermatozoen (Bleil und Wassarman, 1983). Bestimmte Domänen der Polypeptidkette und die strukturelle Intaktheit des Proteingerüsts sind für diese Funktion essentiell (Flormann et al., 1984; Wassarman, 1992). Wird die ZP3-Polypeptidkette durch Proteolyse in kleine Fragmente geteilt, so binden diese zwar an die Plasmamembran des Spermatozoons, die Akrosomreaktion kann jedoch erst ausgelöst werden, wenn die Fragmente beispielsweise über Antikörperbrücken miteinander verbunden werden (Leyton et al., 1989; Leyton und Saling, 1989a). Funktionelle Untersuchungen deuten darauf hin, daß ZP3 zwei unabhängige Bindungsstellen, eine für die primäre Spermatozoenbindung und eine zum Auslösen der Akrosomreaktion besitzt (Kopf und Gerton, 1991). Als korrespondierender Rezeptor des Spermatozoons wird ein 95 kDa Protein vermutet (Leyton und Saling, 1989b; Duncan und Fraser, 1993; Burks et al., 1995), das die Akrosomreaktion moduliert; dieses wird als Zona Rezeptor Kinase (ZRK) bezeichnet (Saling et al., 1995). Bookbinder et al. (1995) wiesen einen für die speziesspezifische Bindung relevanten Spermatozoenrezeptor im Mausmodell nach (sp56).

Nachdem die Reaktion der kortikalen Granula stattgefunden hat, wird das ZP3-Molekül, wahrscheinlich durch eine Glykosidase aus den kortikalen Granula, zu ZP3<sub>f</sub> konvertiert (Wassarman, 1987a); die apparente Molekularmasse wird jedoch nicht verändert. Gereinigtes ZP3<sub>f</sub> kann weder an Spermatozoen binden, noch die akrosomale Reaktion auslösen (Bleil und Wassarman, 1980a). Es werden aber nicht alle ZP3-Moleküle verändert; deshalb können Spermatozoen auch an bereits befruchtete Eizellen binden und akrosomreagieren (Wassarman et al., 1985).

Das ZP3 Gen ist ein im Verlauf der Evolution hochkonserviertes Gen. Die cDNA ist bei einer Reihe von Säugetieren kloniert und sequenziert worden (Chamberlain und Dean, 1989; 1990; Kinloch et al., 1990; Harris et al., 1994) und weist Sequenzhomologien von 70-85 % zwischen den einzelnen Spezies auf. Die Polypeptidketten sind zwischen 415 und 426 Aminosäureresten lang; es kodiert beim Menschen und Maus ein Protein von 424 Aminosäuren (Ringuette et al., 1988; Kinloch et al., 1990; Chamberlain und Dean, 1990). Die Aminosäuresequenzen der untersuchten Spezies stimmen zu 63-84 % überein (Harris et al.,



1994). Das ZP3-Gen weist 8 Exons auf und umfaßt bei der Maus 8.6 Kb, beim Menschen 10 Kb (Chamberlain und Dean, 1990). 1992 haben van Duin et al. berichtet, daß es im menschlichen Genom zwei ZP3-Gene gibt, die beide auf Chromosom Nr. 7 lokalisiert sind. Eines der ZP3-Gene, POM-ZP3, soll polymorph sein und durch alternatives Splicing für ein verkürztes Protein von 372 Aminosäuren kodieren. Das ZP3 Gen der Maus befindet sich auf Chromosom Nr. 5 (Lunsford et al., 1990).

Die Terminologie der Zona pellucida Proteine ZP1, ZP2, ZP3, die sich aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität der Maus ZP Proteine ergeben hat, ist nicht immer direkt auf andere Spezies übertragbar. Beim Schwein können in der Elektrophorese zwei Proteinfamilien mit Molekularmassen von 55 kDa und 90 kDa nachgewiesen werden. Dabei besitzt das 55 kDa Protein offensichtlich Spermatozoenrezeptoraktivität und wurde als porcines (p) ZP3 bezeichnet. pZP3 besteht aus zwei immunologisch nicht verwandten Polypeptidketten, pZP3 $\alpha$  (55 kDa- $\alpha$ ) und pZP3 $\beta$  (55kDa- $\beta$ ), die sich elektrophoretisch nur nach partieller Hydrolyse der Oligosaccharidketten auftrennen lassen (Hedrick und Wardrip, 1987; Sacco et al., 1987). Die Spermatozoenrezeptoraktivität ist vorwiegend mit den Oligosaccharidstrukturen von pZP3 $\alpha$  assoziiert (Sacco et al., 1989); allerdings scheint beim Schwein die biologische Aktivität nicht so streng zugeordnet zu sein wie bei der Maus, da sowohl ZP3 $\beta$  als auch das 90 kDa Protein eine signifikante inhibitorische Kapazität der Spermatozoen-Zona pellucida Bindung besitzen (Berger et al., 1989). Das ZP3 $\alpha$  Gen ist kloniert und sequenziert worden (Yurewicz et al., 1993); für die anderen Zona Proteine stehen Teilsequenzen zur Verfügung (Töpfer-Peterson et al., 1993; Yurewicz et al., 1993; Koyama et al., 1991), die einen Vergleich mit dem Maussystem auf der Basis der Primärstruktur erlauben. Danach gibt es folgende Analogien:

Maus	Schwein
mZP1	pZP3 $\alpha$
mZP2	90kDa
mZP3	pZP3 $\beta$

Oligosaccharidseitenketten der Zona pellucida Proteine des Schweins sind bekannt. pZP3 $\alpha$  besitzt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen (Yurewicz et al., 1993), die entsprechend von Kohlenhydratanalysen alle glykosyliert sind sowie drei O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide. Für pZP3 $\beta$  errechnen sich drei N-glykosidisch und sechs O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten. Das 90 kDa Protein besitzt keine O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten (Hedrick und Wardrip, 1987). Dabei sind die neutralen N-glykosidisch gebundenen Seitenketten relativ kurze bi-, tri- und tetraantennäre, komplexe Zuckerketten (Noguchi et al., 1992). Die außerordentliche Heterogenität wird durch komplexe, langkettige N-glykosidisch gebundene und O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide verursacht, die repetitierende sulfatierte Lactosamineinheiten am nicht-reduzierenden Ende der Oligosaccharidketten besitzen und zudem noch in unterschiedlichem Maße sialyliert sein können (Noguchi und Nakano, 1992; Hokke et al., 1994; Vliegthart, 1994). Mittlerweile sind auch die N-gebundenen Kohlenhydrate von ZP2 und ZP3 der Maus beschrieben worden. Es handelt sich dabei um vorwiegend saure tri- und tetraantennäre, komplexe Oligosaccharide mit ähnlichen Strukturen wie beim Schwein (Noguchi, Nakano, 1993).

#### **4 Zielstellung**

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Antikörpern gegen synthetische Zona pellucida 3 Peptide, die zur Identifizierung und Charakterisierung definierter Zona pellucida 3 Protein Epitope geeignet sind. Aus den bisher bekannten ZP3 Aminosäuresequenzen, die aus isolierten ZP3 cDNAs verschiedener Spezies abgeleitet wurden, sollten homologe ZP3 Peptidteilsequenzen und spezies-spezifische Aminosäuresequenzen ausgewählt und die entsprechenden Peptide synthetisiert werden. Durch Immunisierung von Kaninchen mit diesen synthetischen Peptiden sollten polyklonale Antikörper gegen homologe ZP3 Domänen und Antikörper gegen spezies-spezifische (Maus) Zona pellucida 3 Aminosäuresequenzen hergestellt werden.

Die anti-ZP3 Peptid Antiseren sollten dann hinsichtlich ihrer Eigenschaften Zona pellucida Antigene immunbiochemisch und immunhistologisch identifiziert charakterisiert werden. Es sollten somit Antiseren gegen definierte ZP3 Epitope generiert werden, mit deren Hilfe es möglich ist, in verschiedenen Spezies ZP3 Protein immunbiochemisch eindeutig darzustellen und zuzuordnen. Durch den Einsatz von ZP3 Antiseren gegen homologe ZP3

Aminosäuresequenzen sollten desweiteren Zona pellucida Proteine von Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenzen nicht bekannt sind, immunbiochemisch identifiziert werden.

Mit immunhistochemischen Methoden sollten die gewonnenen Antikörper charakterisiert werden. An Paraffinschnitten von Ovarien verschiedener Spezies sollte untersucht werden, ob das mausspezifische Antiserum nur Maus Zona pellucida erkennt und ob die Antiseren gegen Aminosäuresequenzen, die in allen bisher bekannten ZP3 Sequenzen vorkommen, die Antigene in allen untersuchten Spezies erkennen. Ferner sollte mittels der ZP3 Antiseren gegen homologe ZP3 Aminosäuresequenzen evaluiert werden, ob die Antikörper als Marker für Zona pellucida 3 Protein in der Zona pellucida von Spezies eingesetzt werden können, deren ZP3 Aminosäuresequenz noch nicht bekannt ist.

In Immunfluoreszenzstudien sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Peptidantiseren auch natives, nicht denaturiertes Zona pellucida Protein erkennen.

Ferner sollte an geteilten humanen Zonae pellucidae (Hemizonae) überprüft werden, ob es hinsichtlich der Bindung von ZP3 Antikörpern Unterschiede gibt, wenn Spermatozoen vorher an die Hemizona gebunden waren oder nicht.

Mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung von Eizell und Zona pellucida

Proteingemischen in einem SDS-Polyacrylamid-Gel sollte weiterhin getestet werden, ob und welche Proteine mit welchen Molekularmassen von anti-ZP3 Antiseren detektiert werden.

Anti-ZP3 Antikörper gegen definierte antigene Domänen des ZP3-Proteins sollten als Marker für die Präsenz von Zona pellucida Protein 3 eingesetzt werden und dazu beitragen, physiologische und pathophysiologische Vorgänge, die bei der Penetration des Spermatozoons durch die Zona pellucida von Bedeutung sind, zu erkennen und zu verstehen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Hersteller und Lieferfirmen**

- (1) Amersham Buchler, Braunschweig
- (2) Bio-Rad, München
- (3) Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld
- (4) Dako, Hamburg
- (5) Dianova, Hamburg
- (6) Fuji, Düsseldorf
- (7) Lucerne, Oakland, CA, USA
- (8) Merck, Darmstadt
- (9) Pierce, Rodgau
- (10) Schleicher & Schüll, Dassel
- (11) Serva, Heidelberg
- (12) Sigma, Deisenhofen
- (13) Vemie Veterinär Chemie GmbH, Impfstoffwerk, Kempen
- (14) Vogel, Gießen

### **2.2 Chemikalien**

Acrylamid/Bis (2)

Ammoniumpersulfat (12)

Benzamidin (12)

Biotinylierter Gel Elektrophorese Standard, Breitbandbereich (2)

Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA) (12)

Chloroform (8)

Citronensäure-Monohydrat (8)

Coomassie Blau R 250 (11)

Deoxycholat (12)

3,3'-Diaminobenzidin (12)

$\alpha$ -D Glucose, wasserfrei (11)

di-Natriumhydrogenphosphat (8)

DNase (12)

Earles Medium (12)

EDC (12)

EDTA (8)

Eisessig (8)

Ekluton 1500 (hCG) (13)

Glycerin (8)

Glycin (8)

Hepes (12)

Hyaluronidase Typ I-S (12)

Hybond<sup>TM</sup>-C, Hybridization transfer-membranes (1)

Immuno Pure Antigen/Antibody Immobilization Kit (9)

Inkomplettes Freundesches Adjuvans (12)

Intergonan (PMSG) (13)

Kaliumdihydrogenphosphat (8)

KLH (Keyhole Limpet (Megathura crenulata) Hemocyanin) (12)

Komplettes Freundesches Adjuvans (12)

Mayers saures Hämalaun (12)

$\beta$ -Mercaptoethanol (12)

Methanol (8)

Mi-Ma Röntgenfilmpplatten für Mammographie (6)

Milchpulver, entfettet trocken (7)

Natriumchlorid (8)

O-Phenylendiamin Dihydrochlorid Tabletten (12)

Paraffin (14)

Percoll<sup>®</sup> (12)

PMSF (12)

Ponceau S (12)

Protein Assay Farbreagenz (2)

Protein Standard I (2)

PVP (Polyvinylpyrrolidon) (12)

Pyonin Y (12)

SDS ( Sodiumdodecylsulfat ) (12)

Silicon Lösung (11)

Silver Stain Kit (2)

Surfact Amps NP-40 Nonidet P40 (9)

Temed ( Tetrametylethylendiamin ) (12)

Triethanolamin (8)

Tris/HCL (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (11)

Trypsin inhibitor Typ II-L: Lima Bean (12)

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat) (12)

Wasserstoffperoxid (8)

Xylol (8)

## 2.3 Antikörper

Anti-Kaninchen Ig vom Schwein (4)

Anti-Kaninchen Ig, Meerrettich Peroxidase-konjugiert (vom Esel) (1)

Anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert (von Ziege) (11)

Cy3<sup>TM</sup>- konjugierter affinitätsgereinigter anti-Kaninchen-IgG (H+L) (vom Esel) (5)

Peroxidase-Anti-Peroxidase Immunkomplex, Kaninchen (4)

Anti-Kaninchen IgG (H+L), Meerrettich Peroxidase konjugiert (von Ziege) (2)

## 2.4 Geräte

Aldo-Xer-Geltrockner, Schütt, Göttingen

Digital-pH-Meter 761 Calimatic, Knick GmbH & Co, Berlin

Microfuge<sup>TM</sup> 12, Beckman, Kalifornien, USA

Mikroskop, Zeiss, Frankfurt

Mikrotiterplattenschüttler, Titertec-Dynatech, Denkendorf

Mikrotom 1212 nach Minot, Leitz, Bensheim

Mini-Protean II<sup>TM</sup> Gel-Elektrophoresekammer, Bio-Rad, München

Mini-Trans Blot<sup>TM</sup> Kammer, Bio-Rad, München

Multiscan MCC Elisa Reader, Titertec-Dynatech, Denkendorf

Power Supply 1000/500<sup>TM</sup>, Bio-Rad, München

Stereomikroskop, Wild Heerbrugg, Leitz, Bensheim

Suprafuge22, Rotor HFA 2250, Heraeus, Hanau

## **2.5 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden ca. 3 Monate alte weibliche weiße Neuseeländer-Kaninchen und 7-8 Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse und 4 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden von der Firma Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, bezogen.

## **2.6 Peptide**

Die cDNA Sequenz des ZP3 Proteins ist bei mehreren Spezies (z.B. Hamster, Maus, Mensch und Krallenaffen) bekannt (Kinloch et al., 1990; Chamberlin et al., 1990, Harris et al., 1994). Aus dieser Aminosäuresequenz wurden verschiedene Teilsequenzen ausgewählt, die zum einen nur in der Maus vorkamen, zum anderen in allen bisher bekannten ZP3

Aminosäuresequenzen zu finden waren. Abb.6 zeigt die Primärstruktur des murinen und des humanen ZP3 Polypeptids (Ein-Buchstaben Code).

Synthetische ZP3 Peptide wurden von Herrn Dr. Brüller, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, nach der Merrifield-Methode synthetisiert (Barany et al., 1979). Zur Auswahl der synthetischen Peptide wurde ein Computerprogramm ( Predict ) eingesetzt, das potentielle immunogene Determinanten von Protein-Aminosäuresequenzen rechnerisch ermittelt (Krchnak et al., 1987).



h	M E L S Y R L F I C L L L W G S T E L C Y P Q P L W L L Q G	
m	M A S S Y F L F L C L L L C G G P E L C N S Q T L W L L P G	
h	G A S H P E T S V Q P V L V E C Q E A T L M V M V S K D L F	
m	G T P T P V G S S S P V K V E C L E A E L V V T V S R D L F	
h	G T G K L I R A A D L T L G P E A C E P L V S M D T E D V V	
m	G T G K L V Q P G D L T L G S E G C Q P R V S V D T D V V	
h	R F E V G L H E C G N S M Q V T D D A L V Y S T F L L H D P	
m	R F N A Q L H E C S S R V Q M T K D A L V Y S T F L L H D P	
h	R P V G N L S I V R T N R A E I <u>P I E C R Y P R Q G N V S S</u>	ZP3-5
m	R P V S G L S I L R T N R V E V <u>P I E C R Y P R Q G N V S S</u>	
h	Q A I L P T W L P F R T T V F S E E K L T F S L R L M E E N	
m	H P I Q P T W V P F R A T V S S E E K L A F S L R L M E E N	
h	W N A E K R S P T F H L G D A A H L Q A E I H T G S H V P L	
m	W N T E K S A P T F H L G E V A H L Q A E V Q T G S H L P L	
h	R L F V D H C V A T P T P D Q N A S P Y H T I V D F H G	
m	Q L F V D H C V A <u>T P S P L P D P N S S P Y H F I V D F H G</u>	ZP3-2
h	C L V D G L T D A S S A F K V P R P G P D T L Q F T V D V F	
m	C L V D G L S E S F S A F Q V P R P R P E T L Q F T V D V F	
h	H F A N D S R N M I Y I Y C H L K V T L A E Q D P D E L N K	
m	H F A N S S R N T L Y I T C H L K V A P A N Q I P D K L N K	
h	A C S F S K P S N S W F P V E G P A D I C Q C C N K G D C G	
m	A C S F N K T S Q S W L P V E G D A D I C D C C S H G N C S	
h	T P S H S R R Q P H V M S Q W S R S A S R N R R H V T E E A	
m	N S S S S Q F Q I H G P R Q W S K L V S R N R R H V T D E A	
h	<u>D V T V G P L I F L</u> D R R G D H E V E Q W A L P S D T S V V	ZP3-6
m	<u>D V T V G P L I F L</u> G K A N D Q T V E G W T A S A Q T S V	
h	L L G V G L A V V V S L T L T A V I L V L T R R C R T A S H	
m	A L G L G L A T V A F L T L A A I V L A V T R K C H S S S Y	
h	P V S A S E	
m	L V S L P Q	

Abb. 6: Primärstruktur des ZP3 Polypeptids bei Mensch und Maus im Ein-Buchstaben Code

h = Human    m = Maus

### **2.6.1 Immunisierung und Gewinnung von Antiseren**

Je 5 mg der verwendeten Peptide wurden in 0,5 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und zu 10 mg KLH, gelöst in 1,5 ml H<sub>2</sub>O, gegeben. Dann wurden 5 mg EDC (in 0,5 ml H<sub>2</sub>O) unter Rühren langsam hinzugegeben. Nach einstündigem Rühren wurden weitere 5 mg EDC (in 0,5 ml H<sub>2</sub>O) zu der Reaktionslösung gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Konjugat in einen Dialyseschlauch gefüllt und 3 mal je 1,5 Stunden gegen jeweils 5 l destilliertes Wasser bei 4°C dialysiert, um freies EDC zu entfernen. Die konjugierte Antigenlösung wurde mit komplettem Freund'schen Adjuvans im Verhältnis von 1:2 (v/v) emulgiert. Eine stabile Wasser in Öl-Emulsion wurde durch wechselseitiges Aufziehen in zwei miteinander verbundenen Luer-Lock-Spritzen hergestellt. Bei der Erstimmunisierung wurde 1mg emulgiertes Konjugat in komplettem Freund'schen Adjuvans pro Kaninchen a 100µl entlang des Rückens intrakutan appliziert. Die erste Auffrischung (mit 1mg Peptid/KLH-Konjugat) erfolgte 4 Wochen nach der Erstimmunisierung, die zweite Auffrischung (mit 0,5mg Peptid/KLH-Konjugat) 4 Wochen darauf, wobei das Peptid/KLH-Konjugat jeweils mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans emulgiert wurde. Pro Peptid wurden 3 Kaninchen immunisiert.

Als Negativkontrolle und zur Verlaufskontrolle des Antikörpertiters wurden den Kaninchen vor der Erstimmunisierung und 4 und 8 Wochen danach durch Punktion der Ohr randvene Blut entnommen. Das Blut wurde zur Serumgewinnung zwei Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend 5 min. bei 12 400 x g zentrifugiert. Der Nachweis spezifischer Antikörper erfolgte mittels des ELISA.

### **2.6.2 Enzyme linked immunosorbent assay ( ELISA ) zur Titerbestimmung**

Als Nachweissystem der Antikörperproduktion gegen die synthetischen Peptide und zum Titerverlauf wurde der ELISA eingesetzt. Die entsprechenden Peptide wurden in aqua dest. gelöst, 100µl dieser Lösung (1,5µg Peptid) pro Vertiefung in ein 96-Loch Kunststoffmodul

(mittelaaffine Proteinbindungskapazität) gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C im Trockenschrank wurden die Module zweimal in TPBS und einmal in PBS pH 7,4 gewaschen, um nicht adsorbiertes, überschüssiges Antigen zu entfernen. Nach kräftigem Ausschlagen der Module wurden 100µl der zu testenden Antiseren in adäquaten Verdünnungen in PBS mit 1% BSA einpipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben. Nach gründlichem Ausschlagen der Module wurden Peroxidase markierte anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:3000 in 1%-iger PBS/BSA Lösung verdünnt) in einem Volumen von 100µl pro Vertiefung pipettiert. Die Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler geschüttelt. Im Anschluß an einen dritten Waschschrift wurden pro Vertiefung 100µl Reaktionssubstrat (OPD, 0,5mg/ml, gelöst in Substratpuffer, plus 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, f.c.) hinzugefügt. Nach 20 minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 3 M HCL abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm in einem Multiscan MCC ELISA Reader<sup>R</sup> gemessen.

PBS Puffer, pH 7.4

120 mM Natriumchlorid

4 mM Kaliumdihydrophosphat

10 mM di-Natriumhydrophosphat

TPBS Puffer, pH 7.4

0,05% v/v Tween 20 in PBS

Substratpuffer, pH 4

0.2 M di-Natriumhydrophosphat

0.1 M Citronensäure

## **2.7 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern**

### **2.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung von Immunglobuline über immobilisierte synthetische Peptide**

Die zur Antikörperreinigung benötigten Affinitätsmatrix wurde mit dem Immuno Pure Antigen/Antibody Immobilization Kit hergestellt. 2 ml Gelvolumen Sepharose 4B wurden entsprechend den Angaben des Herstellers mit Bromcyan aktiviert. Anschließend wurden 10 mg des zur Antikörperreinigung vorgesehenen Peptides kovalent an die Säulenmatrix gekoppelt. Der prozentuale Anteil des an das Säulenmaterial kovalent gebundenen synthetischen Peptids wurde mittels Pierce's BCA Protein Assay Reagent berechnet. Zur Antikörperreinigung wurden jeweils 2ml des zuvor 10 min. bei 10 000 x g zentrifugierten Antiserums auf die mit Phosphatpuffer (PBS) äquilibrierte Peptid-Affinitätschromatographie-Säule gegeben und 15-30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml entgastem Phosphatpuffer, pH 7,4 gewaschen. Die an das Peptid gebundenen spezifischen ZP3 Peptid Antikörper wurden somit von dem Serum getrennt. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Immunglobuline wurde ein 0,1M Glycin-HCl Puffer, pH 2,8 verwendet. Die eluierten Peptidantikörper wurden in 1 ml Fraktionen portioniert in vorgepufferten (15µl 1M Tris, pH 7,5) Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgefangen. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe des Bio-Rad Proteinassay in 96 Loch-Mikrotiterplatten bestimmt (siehe 2.8). Nach Einstellen des pH Wertes auf 7,5 wurden die gereinigten Antikörperfraktionen mit annähernd gleichem Proteingehalt vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Titerbestimmung der eluierten Antikörper erfolgte im ELISA.

### **2.7.2 Isolierung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum mittels**

#### **Säulenchromatographie an Protein A-Sepharose**

Zur IgG-Isolierung aus Antiseren wurde eine Protein A-Sepharose Affinitätschromatographiesäule verwendet (Forsgren und Sjoquist, 1966; Langone, 1982). Protein A von *Staphylococcus aureus* wurde kovalent an eine Sepharose 4-CLB gekoppelt. Der Mechanismus zur Anreicherung von Antikörpern beruht auf einer hohen Affinität zwischen dem aus *Staphylococcus aureus* gewonnenen Protein A und dem F<sub>C</sub>- Teil von Immunglobulinen (IgG) Molekülen.

Die Gewinnung der IgG Fraktionen aus den Antiseren, die Proteinbestimmungen sowie die Titerbestimmungen der eluierten IgG erfolgten im wesentlichen wie unter 2.7.1 beschrieben.

### **2.8 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung der gereinigten Antikörperfraktionen fand nach der Methode von Bradford statt (Bradford, 1976). Zur Anwendung kam ein Proteinassay der Firma Bio-Rad. Als Standard diente Rindergammaglobulin mit einem Proteingehalt von 1,4 mg/ml. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die photometrische Messung wurde 15 min. nach dem Vermischen von Probe und Farbreagenz bei einer Wellenlänge von 620 nm durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Titertech-Gerät direkt in den Mikrotiterplatten.

## **2.9 Gewinnung von Ovarien und Eizellen**

### **2.9.1 Schweine Eizellen**

Die Ovarien stammten von ca. 6-9 Monaten alten gesunden Schweinen, die vom Schlachthof Gießen zur Verfügung gestellt wurden. Die Ovarien wurden gekühlt transportiert und innerhalb von 2 Stunden zur Eizellgewinnung weiterverarbeitet. Zur Gewinnung von Schweine Eizellen wurden die Follikel frischer Ovarien punktiert. Die Follikelgröße betrug durchschnittlich 5-8 mm. Nach gründlicher Spülung der punktierten Follikel mit isotonischer Kochsalzlösung wurde der Follikelinhalt unter einem Stereomikroskop beurteilt und die darin befindlichen Eizellen mit einer silikonisierten, ausgezogenen Pasteurpipette aufgesaugt. Die Eizellen wurden anschließend in einem PBS-Puffer unter Zusatz von 2 mM Na-Citrat und 2 mM EDTA aufgenommen. Das Abtrennen der die Eizellen umgebenden Kumuluszellen (Denudieren) erfolgte durch mehrmaliges Aufziehen der Eizellen mit einer silikonisierten, fein ausgezogenen Pasteurpipette. Dabei war der Durchmesser der Pasteurpipette nur geringfügig größer als der der Eizelle. Die von Kumuluszellen befreiten Eizellen wurden bis zu ihrer Weiterverwendung in PBS Puffer bei -80°C aufbewahrt.

### **2.9.2 Maus Eizellen**

Zur Gewinnung von Mauseizellen dienten 7-8 Wochen alte NMRI-Mäuse (Charles-River-Wiga-GmbH ,Sulzfeld). Die Superovulation wurde durch eine i.p. Injektion von 10 IE PMSG und einer 48 Stunden danach erfolgten i.p. Injektion von 10 IE hCG induziert. Die Mäuse wurden 14 Stunden nach der letzten Injektion durch cervicale Dislokation getötet. Nach Präparation von Ovar und Salpinx wurde die erweiterte Ampulla unter dem Stereomikroskop dargestellt und eröffnet. Die ausgetretenen Kumulusmassen mit den darin befindlichen Eizellen wurden zur Denudierung in 0,1% Hyaluronidase (w/v) in Earles-Medium transferiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Eizellen durch wiederholtes

Aufziehen in einer Pasteurpipette von den Kumulusmassen befreit, in frischem Earles-Medium durch mehrmaliges Aufsaugen gewaschen und in PBS Puffer bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt.

### 2.9.3 Humane Eizellen

Nach vorherigem Befragen der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität, die die geplanten Untersuchungen positiv begutachtete, wurden die Untersuchungen mit menschlicher Zona pellucida durchgeführt. Bei den Eizellen handelte es sich um überzählige, nicht befruchtete Eizellen aus dem in-vitro Fertilisationsprogramm, die verworfen worden wären. Die Eizellen wurden in HAM's F-10 Kulturmedium im Inkubator bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Nach Zugabe von 0,1% Hyaluronidase (w/v) in HAM's F-10 Kulturmedium wurden die Eizellen von den Kumulusmassen getrennt. Nach mehreren Waschschritten in PBS Puffer wurden die Eizellen (Metaphase I oder II) bei 4 °C in einer hyperosmolaren Salzlösung gelagert, wodurch die Eizellen ihre Befruchtungsfähigkeit verloren und somit in späteren Versuchen eine akzidentelle Befruchtung ausgeschlossen wurde.

HAM's F-10 Kulturmedium, pH 7,4

1 l Nutrient Mixture F-10 HAM  
5 ml L-Glutamin Lösung 200 mM  
1% v/v Penicillin/Streptomycin Lösung  
0,3% w/v Rinderserumalbumin Fraktion V

Hyperosmolare Salzlösung, pH 7,4

1,5 M Magnesium Chlorid Hexahydrat  
0,1% w/v Polyvinylpyrrolidon  
40 mM Natrium-Hepes

## **2.10 Isolierung der Zona pellucida**

### **2.10.1 Mechanische Isolierung von Schweine und Maus Zona pellucida**

Isolierte Eizellen wurden mit einer silikonisierten Pasteurpipette, deren Durchmesser kleiner war als die Eizelle selbst, mehrmals aufgezogen. Dadurch wurde die Zona pellucida mechanisch eröffnet und die Eizelle konnte durch den entstandenen Spalt austreten. Die so separierten Zonae pellucidae wurden gesammelt und mehrmals in PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in PBS Puffer gesammelt, lyophilisiert und bei -80°C gelagert.

Zona pellucida 3 Proteine, die aus der ZP von Schweineeizellen gewonnen wurden, wurden von Frau Prof. Dr. Töpfer-Petersen, Hannover, zur Verfügung gestellt. Bei diesen porcinen Zona pellucida Proteinen handelte es sich um gereinigte, mit biochemischen Methoden enzymatisch partiell deglykosylierte Proteinfractionen, die als ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  bezeichnet werden (Töpfer-Petersen et al., 1993).

### **2.10.2 Isolierung von Maus Zona pellucida durch Percoll-Gradientenzentrifugation**

Diese Methode diente zur Gewinnung quantitativer Proteinmengen an Maus Zonae pellucidae. Vierzig 4 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse wurden durch cervicale Dislokation getötet. Die gewonnenen Ovarien wurden zunächst in 4 ml Homogenisationspuffer (HB-Puffer) gesammelt. Nach Zugabe von 4 mg Lima Bean Trypsin Inhibitor, 40 $\mu$ l DNase (Stocklösung 25mg/ml) und 40 $\mu$ l Hyaluronidase (Stocklösung 25mg/ml) wurden die Ovarien mit einem Dounce-Homogenisator (Stempel A) durch 20-maliges Auf- und Abbewegen des Stempels homogenisiert. Nach Hinzufügen von 40 $\mu$ l Nonidet-P 40 und 4 $\mu$ l PMSF (Stocklösung 100mM in Ethanol) wurde das Gewebe erneut homogenisiert (20 mal). Zu dem Ansatz wurden 200 $\mu$ l Deoxicholat (20% w/v) gegeben und mit Stempel B 20 mal homogenisiert.



Zur Herstellung des Percollgradienten wurden 6,48 ml Percoll, 1% PVP (gelöst in H<sub>2</sub>O) und 2,52 ml HB Puffer (2-fach konzentriert) vermischt. Das Ovarienhomogenat wurde mit einer Pasteurpipette auf die Percolllösung geschichtet. Durch eine Zentrifugation über 65 min. bei 4°C bei 50 000 x g im Festwinkelrotor (HFA 2250) in einer Suprafuge 22 stellte sich der Percollgradient ein und die Bestandteile des Homogenats wurden nach ihrer Dichte aufgetrennt. Die Zona pellucida stellte sich nach der Zentrifugation als ein 1,5-2 mm breiter opaleszenter, heller Ring im oberen Drittel des Gradienten dar und wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Die gewonnenen Maus Zonae pellucidae wurden in einem "freeze and thaw" Puffer (FT-Puffer) zu gleichen Volumenanteilen gemischt. Die Zona pellucida Suspension wurde dann 3 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde die Zona pellucida Suspension 1 mal in FT-Puffer und 1 mal in HB-Puffer bei 10 000 x g für 15 min. gewaschen, portioniert und bei -80°C gelagert.

#### Homogenisationspuffer (HB-Puffer)

25 mM Triethanolamin  
150 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O  
1 mM CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O

#### Freeze-Thaw Puffer (FT-Puffer)

119.37 mM NaCl  
4.78 mM KCL  
1.70 mM CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O  
1.19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1.19 mM MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O  
60 U/ml Pen/Strep  
25 mM NaHCO<sub>3</sub>  
10 mM Hepes  
5.6 mM Glucose  
0.02% BSA

0.2% NP-40  
 10 mM EDTA  
 1 mM PMSF  
 10 µg/ml LBTI  
 1% Polyvinylpyrrolidone

## **2.11 Paraffinschnitte aus Ovarien**

Säugerovarien (Mensch, Schwein, Rind, Hamster, Ratte und Maus) wurden in Methacarn-Fixans, bestehend aus 6 Teilen Methanol, 3 Teilen Chloroform und einem Teil Eisessig über 24 Stunden fixiert (Romeis 1989). Anschließend wurden die Ovarien über 4 Stunden in 96% Ethanol, dann über 4 Stunden in 100% Isopropanol dehydriert und abschließend 12 Stunden lang in Xylol entfettet. Nach Fixierung wurden die Ovarien über 8 Stunden bei 60°C in flüssiges Paraffin eingebettet und zum Aushärten für weitere 12 Stunden bei 4°C gelagert. Von dem so vorbereiteten Gewebe wurden Paraffinschnitte (Schnittdicke 4-6µm) mit einem Leitz-Ultramikrotom hergestellt.

## **2.12 Humane Hemizonae pellucidae**

Menschliche Hemizonae pellucidae und menschliche Ovarien wurden von Prof. Oehninger, The Jones Institute for Women`s Health, Eastern Virginia Medical School Norfolk, Virginia, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Eizellen wurden aus menschlichen Eierstöcken post mortem gewonnen und in HAM's F-10 Kulturmedium zerkleinert. Die gewonnenen Eizellen wurden in einer hyperosmolaren Salzlösung bei 4°C gelagert und konnten über mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung wurden die Oozyten in PBS Puffer gewaschen und von den umgebenden Kumuluszellen mechanisch befreit. Die Denudierung der Eizelle wurde

dadurch erreicht, daß die Oozyte mehrfach durch eine Glaspipette gesaugt wurde; der Durchmesser der Pipette darf nur wenig größer sein als der Durchmesser einer Eizelle. Die Oozyten wurden anschließend mit Hilfe eines Mikromanipulators (Narishige) und eines inversen Mikroskops in zwei gleiche Hälften geteilt und durch mehrmaliges Spülen vom Oolemm und Ooplasma getrennt.

Anschließend wurde ein Teil der Hemizona Paare dem Hemizona Assay zugeführt (Burkman 1988). In diesem Test werden Patientensperma und Sperma von einem fertilen Spender betreffend der Spermatozoen-Zona pellucida Bindung verglichen. Eine Hemizona wird mit Spermatozoen eines fertilen Spenders, die entsprechende Hemizona mit Patientenspermatozoen inkubiert. Abschließend werden die an die Hemizona gebundenen Spermatozoen gezählt und miteinander verglichen. Die jeweiligen Hemizonae wurden nach Beendigung des Hemizona Assays auf mit Polylysin beschichtete Objektträger verbracht und bei Raumtemperatur getrocknet.

Ein weiterer Teil der Hemizonapaare wurde ohne Zusatz von Spermatozoen in Medium inkubiert, auf Polylysin beschichtete Objektträger gegeben und getrocknet.

Die Eizellen befanden sich in der Regel im Reifegrad der Metaphase I oder II.

HAM's F-10 Kulturmedium, pH 7,4

1l Nutrient Mixture F-10 HAM

5 ml L-Glutamin Lösung 200 mM

1% v/v Penicillin/Streptomycin Lösung

0,3% w/v Rinderserumalbumin

Fraktion V

Hyperosmolare Salzlösung, pH 7,4

1,5 M Magnesium Chlorid Hexahydrat

0,1% w/v Polyvinylpyrrolidon

40 mM Natrium-Hepes

## **2.13 Charakterisierung der Antiseren**

### **2.13.1 Immunhistochemie mit Paraffinschnitten**

Die hergestellten Paraffinschnitte von Ovarien verschiedener Spezies wurden zunächst mit Xylol entparaffiniert. Zur schonenden Wässerung der Schnitte wurden diese zunächst einer absteigenden Alkoholreihe (100% Isopropanol, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol) zugeführt. Nachdem die Schnitte in PBS Puffer gewaschen worden waren, wurden sie zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase für 15 min. mit 3% Wasserstoffperoxid überschichtet. Im Anschluß daran wurden die Schnitte wieder in PBS Puffer gewaschen. Um unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu verhindern, folgte eine 30-minütige Präinkubation in 1% Milchpulver/PBS (w/v). Dann wurde das Antiserum in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 1% Milchpulver (w/v) auf einen Schnitt gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte 3 mal für 5 min. mit PBS Puffer gewaschen. Danach wurde der Zweitantikörper (anti-Kaninchen Immunglobulin) in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Milchpulver/PBS (w/v) für 30 min. aufgetragen. Der Zweitantikörper ist ein sogenannter Brückenantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist und im molaren Überschuß eingesetzt wurde. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS Puffer folgte dann eine 30 minütige Inkubationszeit mit einem Peroxidase-anti-Peroxidase Immunkomplex (PAP-Kaninchen), ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Milchpulver/PBS (w/v) für 30 min. Die PAP diente der Darstellung des Erstantikörpers über den Zweit- oder Brückenantikörper, wobei sich der PAP-Immunkomplex an die Bindungsvalenz des Zweitantikörpers lagert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS Puffer wurden die Gewebeschnitte in eine DAB-haltige Substratlösung verbracht (Diaminobenzidin, 200 mg/l in Natriumacetatpuffer, pH 6,0). Zum Starten der Reaktion wurde 0,03% (f.c.) Wasserstoffperoxid eingesetzt. DAB ist ein Chromogen, das durch Wasserstoffperoxid und dem Enzym Meerrettich Peroxidase zu einem wasserunlöslichen, bräunlichen Farbprodukt umgesetzt wird. Die Inkubationszeit mit DAB betrug 20 min. Danach wurden die Schnitte zuerst in PBS Puffer, dann in aqua dest. für jeweils 5 min. gewaschen. Zur Gegenfärbung der

Zellkerne wurden die Schnitte mit Hämalaun für 5 min. gefärbt. Nach 10 min. Spülen in Leitungswasser stellten sich die Zellkerne blau dar. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert (50%, 70%, 80%, 96% Ethanol, 100% Isopropanol) und nach Entfettung mit Xylol mit Corbit-Balsam eingedeckt.

Zur Abklärung inwieweit ZP3 Antiseren spezifisch ihr Antigen detektieren, wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt: 1. Die Schnitte wurden mit einem Präimmunserum in gleicher Verdünnung wie das Antiserum inkubiert, 2. Die Bindung der eingesetzten Antikörper an ZP3 Protein wurde mit dem synthetischen ZP3 Peptid blockiert, gegen das sie gerichtet sind. Dazu wurde das entsprechende Antiserum (1:200 verdünnt) vor dem Auftragen auf den Paraffinschnitt mit dem jeweiligen synthetischen Peptid (5 µg/ml) für 2 Stunden inkubiert. Wenn alle Antikörper mit dem Antigen abgesättigt sind, können diese folglich nicht mehr an ZP3 Protein binden.

Alle Inkubationschritte erfolgten bei Raumtemperatur und in einer feuchten Kammer.

### **2.13.2 Immunhistochemie an humanen Hemizonae**

Die humanen Hemizonae (auf mit Polylysin beschichteten Objektträgern fixiert) wurden 3 mal für 5 min. bei Raumtemperatur mit PBS Puffer gewaschen. Es folgte eine 2 stündige Präinkubation in 3% BSA/PBS (w/v) Puffer, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. Dann wurde das Serum in einer Verdünnung von 1:100 in 3% BSA/PBS (w/v) auf die entsprechende Hemizonae gegeben. Die eine Hälfte der Zona pellucida wurde mit dem Antiserum, die korrespondierende Hemizona mit dem Präimmunserum als Negativkontrolle inkubiert. Aus jeder Eizelle konnte somit eine Test-Hemizona und eine Kontroll-Hemizona als interne Kontrolle gewonnen werden. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Hemizonae in PBS Puffer gewaschen (3 mal für 5 min. in 3% BSA/PBS w/v). Dann wurde der Zweitantikörper, ein anti-Kaninchen Immunglobulin, 1:100 in 3% BSA/PBS w/v verdünnt, für 30 min. aufgetragen. Es folgte ein weiterer Waschschrift (3 mal für 5 min. in 3% BSA/PBS w/v), dem sich die Inkubation mit Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP-Kaninchen) in

einer Verdünnung von 1:100 in 3% BSA/PBS (w/v) anschloß. Nach 30 min. wurden die Hemizonae gewaschen (3mal für 5 min. in 3% BSA/PBS w/v) und dann mit der DAB-haltigen Substrat-lösung für etwa 20 min. inkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde 0,03% f.c. Wasserstoff-peroxid zugegeben. Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch die Peroxidase-anti-Peroxidase Methode und DAB als Substrat nachgewiesen. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Corbit-Balsam eingedeckt (siehe auch 2.13.1.).

Eingesetzt wurden Hemizonae, die den Hemizona Assay durchlaufen hatten, sowie Hemizonae, die nicht mit Spermatozoen inkubiert wurden.

Alle Inkubationschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

### **2.13.3 Indirekter Immunfluoreszenztest an isolierten Eizellen**

Unbehandelte, denudierte Schweineeizellen und menschliche Eizellen wurden in PBS Puffer in Falcon Kulturgewebsschalen für 20 min. gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Eizellen mit den entsprechenden ZP3 Antiseren (1:100 verdünnt in 3% BSA/PBS w/v). Als Negativkontrolle wurden die Eizellen mit einem Präimmunserum in gleicher Verdünnung wie das Antiserum inkubiert und wie im Folgenden beschrieben weiter behandelt.

Nach dem Entfernen nicht gebundener Antikörper durch Waschen der Eizellen in PBS Puffer (2 mal 10 min.) wurden die Eizellen mit dem Zweitantikörper inkubiert. Eingesetzt wurden FITC-markierte anti-Kaninchen-IgG (1:160 verdünnt in 3% BSA/PBS w/v) oder Cy-3 konjugierte anti-Kaninchen-IgG (1:600 verdünnt in 3% BSA/PBS w/v) Antikörper. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten wie oben aufgeführte Waschschrte.

Abschließend wurden die Eizellen auf einen Objektträger transferiert, mit Eindeckmittel (PBS/Glycerin, im Verhältnis 1:1) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop konnte die Bindung der Antikörper an ihr entsprechendes

Antigen durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden (FITC bei 450-490 nm, Cy-3 bei 546 nm).

## **2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteingemische wurden elektrophoretisch durch ein diskontinuierliches, denaturierendes Gelelektrophoresesystem nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Zur optimalen Auftrennung der Proteine wurden 7,5%-ige und 10%-ige Trenngele, sowie 6%-ige Sammelgele eingesetzt.

Zwischen zwei mit Methanol entfetteten Glasscheiben (12 x 15 cm) einer Mini-Protean Gel-Elektrophorese-Kammer wurden zwei Distanzstäbe (Spacer, 0,75 mm Dicke) eingelegt und mit den dafür vorgesehenen Halterungen fixiert. Das Trenngel wurde anschließend in den Zwischenraum, den beide Glasplatten bildeten, gegossen und mit Propanol überschichtet, um ein Austrocknen während der Polymerisation zu verhindern. Nach Abschluß des Polymerisationsprozesses (1 Stunde) wurde der Alkohol abgegossen und das Trenngel mit aqua dest. gespült. Das Sammelgel wurde anschließend eingegossen und ein Gelkamm (10 Taschen, 0,75 mm dick) zwischen die Glasplatten geschoben. Der Gelkamm wurde nach dem Polymerisieren des Gels entfernt und das Sammelgel mit Laufpuffer überschichtet. Die in Probenpuffer aufgenommen Proteine wurden über 4 min. gekocht und nach dem Abkühlen mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen gefüllt. Dem Probenpuffer wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol (5% v/v) hinzugefügt, unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde kein Mercaptoethanol hinzugegeben. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmassen der aufgetrennten Proteine im Westernblot wurden biotinylierte Standardproteine eingesetzt: Myosin (200 kD),  $\beta$  Galactosidase (116.25 kD), Phosphorylase B (97.4 kD), BSA (66.2 kD), Ovalbumin (45 kD), Carboanhydrase B (31 kD), Sojabohne Trypsin Inhibitor (21.5 kD), Lysozym (14.4 kD) und Aprotinin (6.5 kD). Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei einer konstanten Spannung von 200 V. Nach Beendigung der

Elektrophorese wurde das aufgetrennte Proteingemisch mit Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Probenpuffer, pH 6,8

1% w/v SDS  
1,3 M Glycerin  
5% v/v  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,01% w/v Pyronin Y  
50 mM Tris

Trenngelpuffer, pH 8,8

0,2% w/v SDS  
750 mM Tris/HCL

Sammelgelpuffer, pH 6,8

0,2% w/v SDS  
250 mM Tris/HCL

Laufpuffer, pH 8.3

0,1% w/v SDS  
190 mM Glycin  
25 mM Tris



Trenngel (10%ig)	4,2 ml 30% w/v Acrylamid 6,2 ml Trenngelpuffer 2,0 ml Aqua dest. 17 µl Temed 50 µl 10% w/v Ammonium- persulfat
Trenngel (7,5%ig)	3,15 ml 30% w/v Acrylamid 6,2 ml Trenngelpuffer 3,05 ml Aqua dest. 17 µl Temed 50 µl 10% w/v Ammonium- persulfat
Sammelgel (6%ig)	1,33 ml 30% w/v Acrylamid 3,33 ml Sammelgelpuffer 1,92 ml Aqua dest. 17 µl Temed 50 µl 10% w/v Ammonium- persulfat

### 2.14.1 Coomassie-Blau-Färbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer 0,25% igen Coomassie-Blau Lösung über einen Zeitraum von 1 Stunde gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Entfärbelösung unter Schütteln über 16 Stunden bei

Raumtemperatur. Zur Adsorption des gelösten Farbstoffes wurde ein Schaumstoffstück zugegeben. Nach Entfärbung der Gele und Waschen mit aqua dest. wurden diese auf einem Gelrockner getrocknet, photographiert und archiviert.

Coomassie-Blau-Färbelösung	0,25% w/v Coomassie-Blau
	10% v/v Eisessig
	45% v/v Methanol
	45% v/v Aqua dest.

Entfärbelösung für Coomassie-Blau	10% v/v Eisessig
	45% v/v Methanol
	45% v/v Aqua dest.

## **2.15 Immunoblot**

### **2.15.1 Western-Blot**

Durch einen Western Blot wurden die in der SDS-Gelelektrophorese nach ihren Molekularmassen aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert (Towbin et al. 1979 ). Dafür wurde das im Western-Blot-Puffer befindliche Gel blasenfrei auf eine feuchte Nitrozellulosemembran gelegt, mit zwei feuchten Filterpappen umgeben und zwischen zwei Schaumstoffscheiben gelegt. Diese wurden zwischen zwei Kunststoffscheiben gepreßt und in eine Mini-Protean Western-Blot-Kammer eingelegt. Nach dem Elektrotransfer über 1 Stunde und einer Spannung von 35 V pro Gel wurden die Nitrozellulosemembranen entnommen, getrocknet und anschließend 10 min. in einer 2%igen Ponceau S Lösung gefärbt.

Nach Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit aqua dest. konnte ein regelrechter Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran überprüft und photodokumentiert werden. Die Nitrozellulosemembran wurde entweder sofort zum Immunoblotting weiter-verwendet oder bei Raumtemperatur getrocknet und aufbewahrt. Um festzustellen, ob die aufgetrennten Proteine quantitativ aus dem Polyacrylamidgel eluiert worden waren, wurden eventuell im Gel verbliebenen Proteine zur Kontrolle mit Coomassie-Blau gefärbt.

Western Blot Puffer	250 mM Glycerin
	0,01% w/v SDS
	20% v/v Methanol
	40 mM Tris/HCL

## 2.16 Immunbiochemische Identifizierung von Proteinen

Die Nitrozellulosemembranen mit den darauf befindlichen Proteinen wurden zur Abdeckung unspezifischer Antikörperbindungsstellen in PBS mit 3% Ovalbumin (w/v) über Nacht bei 4°C präinkubiert. Das Färbereagenz Ponceau S war nach der Präinkubation herausgewaschen und störte nicht den nachfolgenden Versuchsverlauf. Die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Antiseren wurden in 0,3% Ovalbumin/PBS (w/v) in einer Verdünnung von 1:200 über eine Stunde mit den auf Nitrozellulosemembranen transferierten Proteinen inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurden die Membranen 2 mal für 15 min. in TPBS Puffer und 2 mal für 10 min. in PBS Puffer gewaschen. Durch eine anschließende zweite Präinkubation mit 3% Ovalbumin in PBS wurden wiederum unspezifische Bindungsstellen für den Zweitantikörper maskiert. Zur Sichtbarmachung spezifisch gebundener Antikörper

wurden Meerrettich-Peroxidase-markierte anti-Kaninchen Ig Antikörper (1:3000 mit 0,3% Ovalbumin/PBS verdünnt) eingesetzt und über 1 Stunde mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Durch anschließende Waschschrte (zweimal in TPBS und zweimal in PBS, Gesamtdauer 50 min.) wurden nicht gebundene Zweitantikörper entfernt. Die Nitrozellulosemembran wurde dann zur Detektion gebundener Antikörper dem Chemilumineszenzverfahren zugeführt.

## **2.17 Chemilumineszenzverfahren**

Zum Nachweis Peroxidase markierter gebundener Antikörper diente das Chemilumineszenzverfahren. Das Substrat ECL (Amersham) wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Die Komponenten des Substrates enthalten eine Wasserstoffperoxidlösung und ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol). Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 min. mit diesem Substrat überschichtet. Abb. 7 zeigt schematisch die Reaktion, die der Chemilumineszenz zugrunde liegt. Das Peroxidasekonjugat setzt das Luminol mit Hilfe von Wasserstoffperoxid um. Das Luminol geht dabei auf ein chemisch angeregtes Energieniveau über, das es durch Emission von Licht wieder verläßt.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach Überschichtung mit Substrat in Klarsichtfolie verpackt und auf geeignetes Filmmaterial (Mi-Ma Röntgenfilmplatten, Fuji) aufgelegt. Die Röntgenfilme wurden je nach Intensität der Reaktion zwischen 1 min. und 30 min. belichtet und abschließend entwickelt und fixiert.

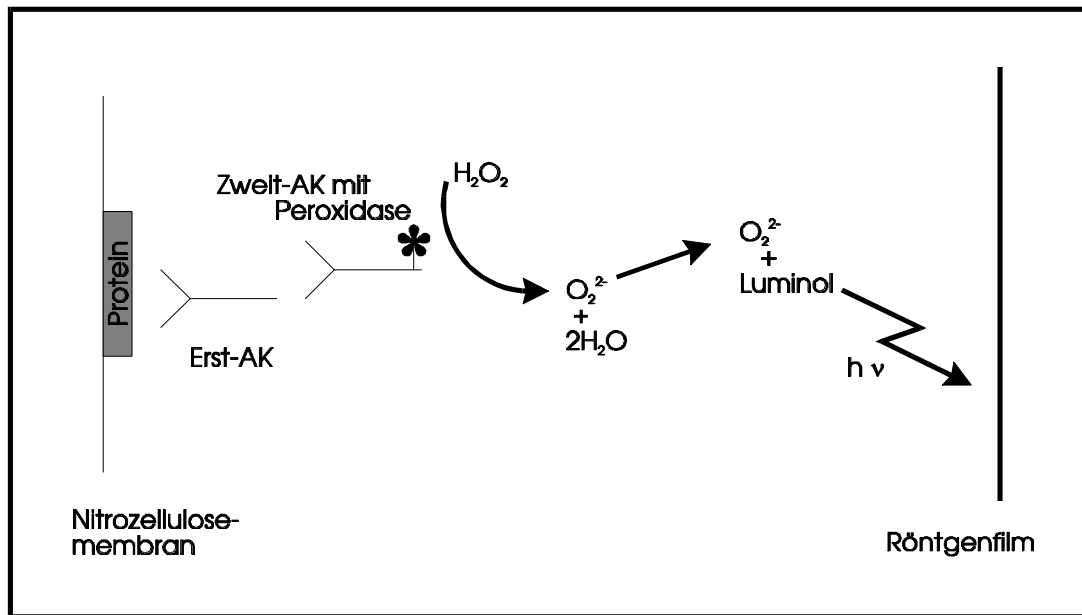


Abb. 7 : Schematische Darstellung der Chemilumineszenz nach Amersham, verändert.

**AK = Antikörper**

## 2.18 Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Durch Entfernen gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran konnte das Immunoblotverfahren mehrfach mit derselben Membran und anderen Antiseren wiederholt werden. Hierzu wurden die Nitrozellulosemembranen mit TPBS gewaschen, um das Substrat zu entfernen. Zur Ablösung der Antikörperkomplexe von den detektierten Polypeptiden wurde die Membran 30 min. lang bei 50°C in einem Puffer inkubiert, der als "Stripping-Puffer" bezeichnet wird. Dieser Puffer enthält als Detergenz SDS und als reduzierende Substanz β-Mercaptoethanol, die zur Ablösung gebundener Erst- und Zweitantikörper von dem Protein führen. Abschließend wurden die Nitrozellulosemembranen in TPBS- und PBS-Puffer gewaschen. Sie konnten über mehrere Tage bei 4°C gelagert und wiederverwendet werden.

Stripping-Puffer, pH 6,8

100 mM β-Mercaptoethanol

2% w/v SDS

62,5 mM Tris/HCL

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Peptide

Die Aminosäuresequenzen der Peptide, die zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt wurden, sind aus bekannten, molekularbiologisch identifizierten cDNA-Sequenzen, die das Zona pellucida 3 (ZP3) Protein verschiedener Spezies kodieren, abgeleitet worden.

Durch Auswahl und Verwendung geeigneter synthetischer ZP3 Peptide zur Immunisierung gelang es, eine breite Palette von Antiseren zu erhalten. Die Charakterisierung der Antiseren erfolgte durch ELISA, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und durch Immunoblot. Die gewonnenen Antiseren sind entweder gegen eine homologe ZP3 Aminosäureteilsequenz, die in der ZP3 Aminosäuresequenz von Mensch, Maus und Hamster vorkommt, gerichtet, oder sie erkennen eine spezies-spezifische (Maus) ZP3 Aminosäuresequenz.

Folgende Sequenzen wurden zur Herstellung der Antiseren gegen ZP3 ausgewählt (Ein-Buchstaben Code ).

Antiserum AS ZP3-2 (mausspezifisch)	T-P-S-P-L-P-D-P-N-S-S-P-Y-H-F-I-V-D-F
Antiserum AS ZP3-5 (homolog)	P-I-E-C-R-Y-P-R-Q-G-N-V-S-S
Antiserum AS ZP3-6 (homolog)	D-V-T-V-G-P-L-I-F-L

Die Maus ZP3 Peptidantiseren wurden als AS ZP3-2 a bis c bezeichnet. Die ZP3 Peptidantiseren, die gegen homologe Teilsequenzen bei Mensch, Maus und Hamster hergestellt wurden, sind als AS ZP3-5 a bis c bzw. AS ZP3-6 a und b benannt worden. Dabei sind die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 gegen zwei synthetische Peptide von verschiedenen, jedoch jeweils homologen Domänen der Aminosäuresequenz des Maus-, Mensch- und Hamster-Zona pellucida 3 Protein gerichtet.

Pro Peptid wurden 3 Kaninchen immunisiert; vom Peptid ZP3-2 und ZP3-5 konnten Antiseren aus 3 Tieren, von Peptid ZP3-6 konnten aus 2 Tieren gewonnen werden. Das dritte Kaninchen ist aus unbekannten Gründen verendet.

### **3.2 Antikörpernachweis mit Hilfe des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Zum Nachweis von Antikörpern gegen synthetische ZP3-Peptide wurden die Kaninchenantiseren mit dem Peptid, das als Antigen eingesetzt wurde, im ELISA getestet. Die Bewertung der Antikörperbindung an das adsorbierte Peptid erfolgte im Vergleich zu den entsprechenden Präimmunseren als Negativkontrollen.

In den Abbildungen 8-10 sind die Extinktionswerte im Verhältnis zum Verdünnungsfaktor der gewonnenen Antikörper dargestellt. Auf der Abszisse wurde der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm aufgetragen. Im ELISA (Abb. 8, 9 und 10) ist der Unterschied in der Bindung an das Antigen zwischen Antikörpern aus Antiseren und den nicht relevanten Antikörpern aus Präimmunseren gegenüber dem adsorbierten synthetischen Peptid deutlich zu erkennen. Während die Antigenerkennung der Antiseren titrationsabhängig war, konnte eine solche Abhängigkeit für das eingesetzte Präimmunserum nicht nachgewiesen werden.

Alle getesteten Antiseren zeigten eine verdünnungsabhängige Antikörperbindung an das entsprechende Antigen. Der höchste Extinktionswert konnte bei dem Antiserum AS ZP3-6 a (Abb. 10) gemessen werden. Im Vergleich dazu zeigten die Antiseren AS ZP3-2 (Abb. 8) und AS ZP3-5 (Abb. 9) bei gleicher Verdünnungsstufe (1:200) geringere Extinktionswerte. Das Antiserum AS ZP3-6 a und die Antiseren AS ZP3-2 a,b und c zeigten einen schnelleren und steileren Extinktionsabfall als AS ZP3-5 a,b und c. Bei den Kontrollseren wurde bei allen Verdünnungsstufen ein konstant niedriger Extinktionswert gemessen. Um eventuelle unspezifische Kreuzreaktionen mit anderen synthetischen ZP3-Peptiden auszuschließen, wurden die Antiseren im ELISA mit anderen synthetischen ZP3-Peptiden als Antigen getestet. Dabei konnte bei keinem der getesteten Antiseren eine unspezifische Kreuzreaktion

mit nicht relevanten synthetischen ZP3-Peptiden nachgewiesen werden. Die Extinktionswerte lagen hier im Bereich der Präimmunseren (nicht gezeigt).

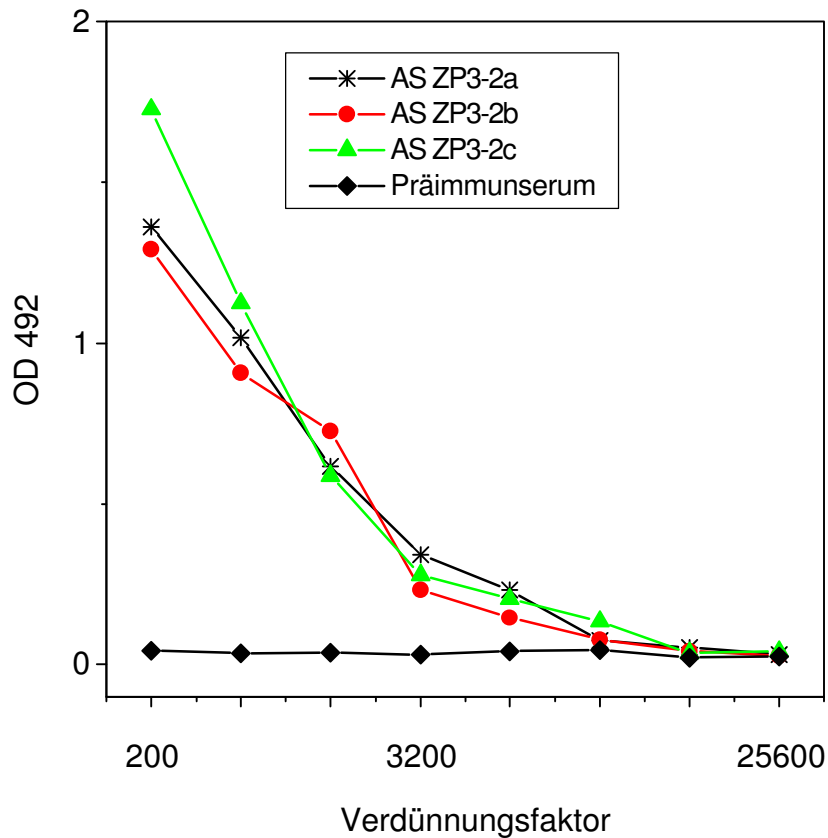


Abb.8 Nachweis von anti-ZP3-Antikörpern im ELISA.

Synthetisches ZP3-2 Peptid wurde an 96 Loch Kunststoffmodule (1,5µg/Loch) adsorbiert und mit Kaninchen Antiseren (AS) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase markiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000 verdünnt) und OPD als Farbreagenz nachgewiesen. Auf der Abszisse ist der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die Extinktion bei 492 nm angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.



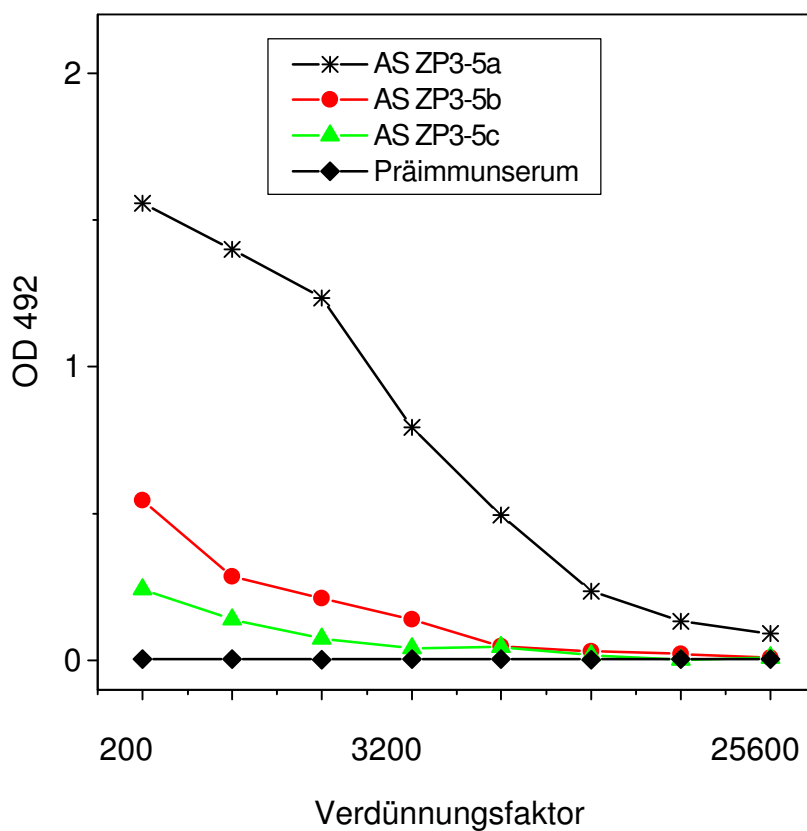


Abb.9 Nachweis von anti-ZP3-Antikörpern im ELISA.

Synthetisches ZP3-5 Peptid wurde an 96 Loch Kunststoffmodule (1,5µg/Loch) adsorbiert und mit Kaninchen Antiseren (AS) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase markiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000 verdünnt) und OPD als Farbreagenz nachgewiesen. Auf der Abszisse ist der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die Extinktion bei 492 nm angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.

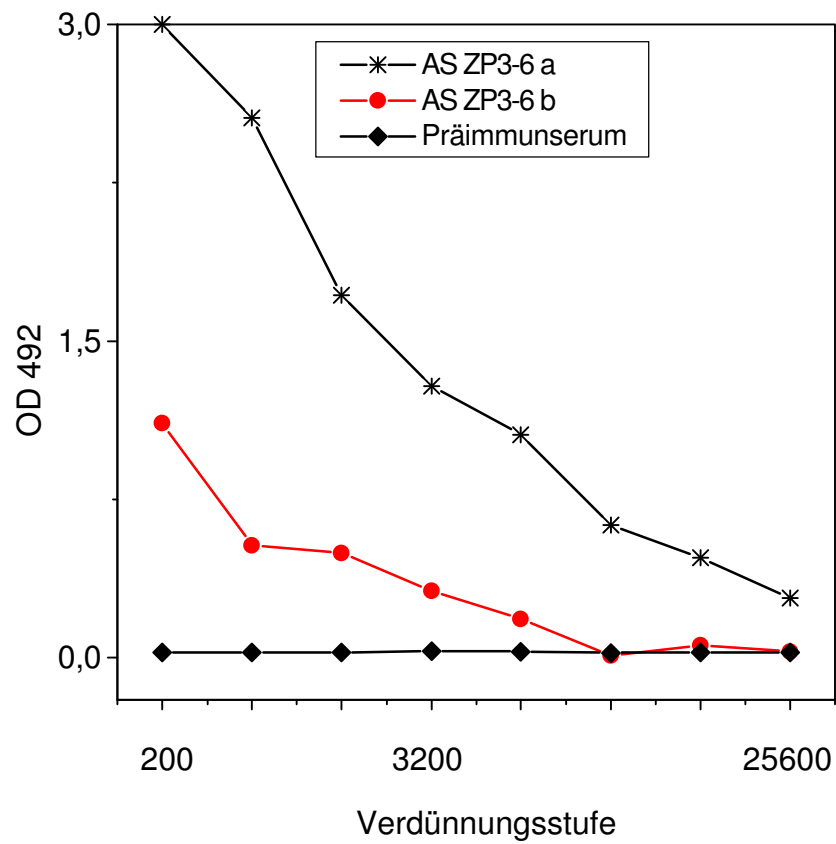


Abb.10 Nachweis von anti-ZP3-Antikörpern im ELISA.

Synthetisches ZP3-6 Peptid wurde an 96 Loch Kunststoffmodule (1,5µg/Loch) adsorbiert und mit Kaninchen Antiseren (AS) inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase markiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000 verdünnt) und OPD als Farbreagenz nachgewiesen. Auf der Abszisse ist der Verdünnungsfaktor der Antiseren, auf der Ordinate die Extinktion bei 492 nm angegeben. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.

### **3.3.1 Reinigung und Konzentrierung der gewonnenen Antikörper über immobilisierte synthetische Peptide**

In den gewonnenen Antiseren befinden sich neben spezifischen Antikörpern auch Serumproteine und nicht relevante Immunglobuline. Um unspezifische Reaktionen mit nicht relevanten Antikörpern oder anderen Proteinen in empfindlichen Testsystemen zu vermeiden, wurden anti-ZP3-Peptidantikörper isoliert und konzentriert.

Die Affinitätschromatographische Isolierung der Antikörper erfolgte mittels Säulenchromatographie über an eine Matrix kovalent gebundene immobilisierte synthetische Peptide. Das Säulenvolumen betrug 2 ml, Fraktionen zu jeweils 1 ml wurden gewonnen.

In der Regel wurden die Fraktionen 2-6 vereinigt, in denen sowohl der Hauptproteinanteil als auch die größte Antikörperaktivität zu finden war. Nach dieser Affinitätschromatographischen Auftrennung standen etwa 4 ml gereinigte Antikörper mit einem Proteingehalt von ca.

0,2 mg/ml zur Verfügung, die bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurden.

Die gereinigten Antikörper wurden anschließend im ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit an ihr synthetisches Peptid überprüft und der Titer der jeweiligen Charge bestimmt.

### **3.3.2 Reinigung und Konzentrierung von Antikörpern über eine Protein A-Säule**

Die Affinitätschromatographische Isolierung von IgG erfolgte mittels Säulenchromatographie über an einer Matrix immobilisiertes Protein A, das aus *S.aureus* gewonnen wird. In der Regel wurden die Fraktionen 2-8 vereinigt. In diesen Fraktionen fanden sich die höchsten Proteinkonzentration und die stärkste Reaktivität von Antikörpern gegen das synthetische Peptid. Nach Elution mit 0,1M Glycin-HCl Puffer, pH 2,8 wurde die Antikörperlösung mit 0,1M NaOH neutralisiert, um eine Denaturierung der Antikörper zu verhindern und ihre funktionelle Integrität zu bewahren. Nach Affinitätschromatographischer Auftrennung standen etwa 4 ml gereinigte IgG Antikörper einem Proteingehalt von 4 mg/ml zur Verfügung. Die Antikörper wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### **3.3.3 Bestimmung der Titer über immobilisierte synthetische Peptide isolierte anti ZP3 Antikörper im ELISA**

Die Anreicherung von anti ZP3 Peptid Antikörpern aus den Antiseren wurden im ELISA mit synthetischem ZP3-6 Peptid als Antigen nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten Präimmunseren oder gereinigte Kaninchen IgG. Die Titrationskurven der gereinigten Antikörper wiesen einen typischen sigmoidalen Verlauf auf (nicht gezeigt). Es zeigte sich eine verdünnungsabhängige Reduktion der Bindung der vereinigten Fraktionen der an synthetisches Peptid gebundenen Antikörper der Antiseren AS ZP3-2, AS ZP3-5 und AS ZP3-6. Präimmunseren bzw. gereinigte Kaninchen IgG waren gegenüber dem ZP3-2, ZP3-5 und ZP3-6 Peptid nicht reaktiv.

### **3.3.4 Bestimmung der Titer der über Protein A isolierten IgG Antikörper im ELISA**

Die Titerbestimmung der über Protein A-Sepharose angereicherten anti ZP3 Peptid IgG erfolgte im ELISA. Als Negativkontrollen wurde Präimmunserum oder gereinigte Kaninchen IgG eingesetzt. Auch hier zeigten die Titrationskurven einen für Antikörperbestimmungen typischen sigmoidalen Verlauf (nicht gezeigt). Bei einem Verdünnungsfaktor von 80 konnte bei den vereinigten Fraktionen der Antikörper der Antiseren im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutlich höherer Extinktion nachgewiesen werden.

## **3.4 Antikörperreaktionen auf fixierten Ovargewebeschnitten**

Die gewonnenen anti ZP3-Antiseren wurden an fixierten Ovargewebeschnitten verschiedener Spezies immunhistochemisch charakterisiert. Zum Einsatz kam Antiserum AS ZP3-2, das gegen eine ausschließlich in der Maus vorkommende Aminosäuresequenz des Zona pellucida 3 Proteins gerichtet ist. Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 detektieren ZP3-5 und ZP3-6

Peptid, zwei unterschiedliche Aminosäureteilsequenzen, die in der Aminosäuresequenz des humanen, murinen und Hamster Zona pellucida 3 Proteins zu finden sind.

Die Bindung der anti ZP3 Peptidantikörper an die Zona pellucida der Eizelle wurde an Ovargewebeschnitten von Maus, Hamster, Ratte, Rind, Schwein und Mensch getestet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bindung von anti ZP3 Antikörpern mit ZP Proteinen verschiedener Spezies

Antiseren	Aminosäure sequenz	Maus	Ratte	Hamster	Schwein	Rind	Mensch
		ZP/O	ZP/O	ZP/O	ZP/O	ZP/O	ZP/O
AS ZP3-2	Maus	++/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AS ZP3-5	Homolog	++/+	+++/-	+++/+	+/+++	++/+	+/+
AS ZP3-6	Homolog	++/+	+/-	+/+	-/-	-/-	+++/+

Tab.1

ZP = Zona pellucida                      O = Ooplasma

- = negative Reaktion, + = schwach positive Reaktion,

++ = deutlich positive Reaktion, +++ = stark positive Reaktion

Während das mausspezifische Antiserum AS ZP3-2 ausschließlich mit der Zona pellucida der Mauseizelle reagierte, detektierte Antiserum AS ZP3-5, das gegen eine konservierte ZP3 Aminosäuresequenz gerichtet ist, die Zona pellucida der Maus, der Ratte, des Hamsters und in geringem Maße auch die Zona pellucida des Menschen. Bei der Eizelle des Schweines war eine außerordentlich kräftige Reaktion im Ooplasma der Eizelle zu erkennen. Die Schweine Zona pellucida stellte sich vergleichsweise schwach dar. AS ZP3-6 reagierte hauptsächlich mit der Zona pellucida der Mauseizelle und der menschlichen Eizelle.

In den Abbildungen 11 und 12 sind die unterschiedlichen immunhistochemischen Anfärbungsmuster an der Zona pellucida verschiedener Säugereizellen mit anti ZP3 Antiseren im Detail dargestellt.

### **3.4.1 Antiserum AS ZP3-2**

Antiserum AS ZP3-2, das gegen eine mausspezifische ZP3 Aminosäuresequenz gerichtet ist, erkannte ausschließlich die Zona pellucida an Maus Ovarschnitten (Abb.11/1). Die Zona pellucida erschien hier als kräftig gefärbter, dunkelbrauner Ring, der die Eizelle umgibt. Keine Reaktion war im Ooplasma selbst oder an den umgebenden Kumuluszellen erkennbar. In Abb.11/2 ist anhand eines Hamsterovarschnittes beispielhaft dargestellt, daß mausspezifische AS ZP3-2 Antikörper selbst an die Zona pellucida einer sehr artverwandten Spezies nicht binden. Hier zeigte sich die Zona pellucida als zart hellgrauer, leicht bräunlich gefärbter Ring. AS ZP3-2 Antikörper reagierten auch nicht mit der Zona pellucida von Ratte, Rind, Schwein und Mensch (nicht gezeigt).

### **3.4.2 Antiserum AS ZP3-5**

Antiserum AS ZP3-5, das gegen eine homologe ZP3 Aminosäureteilsequenz von Maus, Hamster und Mensch ZP3-Protein gerichtet ist, reagierte mit der Zona pellucida bei allen getesteten Spezies. An der Zona pellucida der Eizelle des Schweines stellte sich eine positive Reaktion dar. Diese war jedoch nur als zarte Braunfärbung zu sehen, wogegen sich bei den anderen Spezies, Maus, Ratte, Hamster und Rind die Zona pellucida in Form eines intensiv dunkelbraun gefärbten Ringes zeigte.

Im Vergleich dazu war mit Antiserum AS ZP3-2, das spezifisch gegen Maus ZP3 Protein gerichtet ist, bei der Eizelle der Maus nach Inkubation mit AS ZP3-5 eine positive, aber

insgesamt wesentlich schwächere Immunreaktion an der Zona pellucida nachzuweisen (Abb.11/4).

An der Zona pellucida der Maus (Abb.11/4), des Schweins (Abb.12/1), des Rindes (Abb.12/4) und des Menschen (Abb.12/7) ließen sich zwei unterschiedlich stark angefärbten lamellären Schichten unterscheiden: eine äußere Schicht, die eine wesentlich intensivere und uneinheitliche Braunfärbung zeigte und eine innere Schicht mit einer schwächer ausgeprägten, eher homogenen Braunfärbung.

Die Zona pellucida des Hamsters wies ein kräftiges, dunkelbraunes und eher uniformes Erscheinungsbild im proximalen Teil der Zona pellucida auf; der eizellnahe Teil zeigte eine homogene hellbraune Färbung (Abb.11/10).

Bei der Eizelle der Ratte stellte sich die Zona pellucida als intensiv tief braun und einheitlich angefarbter Ring dar (Abb.11/7).

Auffallend waren in den Gewebeschnitten von Ratte (Abb.11/7), Rind (Abb.12/4) und Mensch (Abb.12/7) sternförmige immunhistochemisch angefarbte Ausläufer. Diese gingen von der Zona pellucida aus und reichten bis zu den umgebenden Kumuluszellen hin.

Mit Ausnahme des Rattenooplasma konnte in allen getesteten Spezies eine leichte, bräunliche Anfärbung des Ooplasmas beobachtet werden. Im Ooplasma des Schweineovars wurde sogar eine außerordentlich kräftige, dunkelbraune, schollige Reaktion nachgewiesen bei relativ schwacher Immunreaktion an der Zona pellucida (Abb.12/1).

### **3.4.3 Antiserum AS ZP3-6**

Antiserum AS ZP3-6, das wie AS ZP3-5 gegen eine homologe Aminosäureteilsequenz des Maus, Hamster und Mensch ZP3-Proteins gerichtet ist, zeigte ein unterschiedliches Anfärbungsmuster der Zona pellucida in den getesteten Spezies. AS ZP3-6 wies eine intensive Reaktion mit der menschlichen Zona pellucida auf (Abb.12/8). Die immunhistochemische Reaktion stellte sich als ein einheitlich, tief braun angefarbter Ring um

die Eizelle dar. Ausläufer mit immunreaktiven Material am äußeren Rand der Zona pellucida waren zwar vorhanden, aber schwächer ausgeprägt als bei Antiserum AS ZP3-5 (Abb.12/7). In den Schnitten von Maus (Abb.11/5), Ratte (Abb.11/8) und Hamster (Abb.11/11) Ovarien war nur eine sehr schwache Immunreaktion im Bereich der Zona pellucida nachzuweisen. Dabei wurde hauptsächlich der innere Rand der Zona pellucida leicht braun angefärbt. AS ZP3-6 Antikörper haben unter den gewählten immunhistochemischen Bedingungen nicht an die Zona pellucida des Schweine- (Abb.12/2) und des Rinderovarschnittes (Abb.12/5) gebunden. Ebenfalls zeigte sich im Ooplasma der Ratte (Abb.11/8), des Schweines (Abb.12/2) und des Rindes (Abb.12/5) keine Anfärbung, wogegen das Ooplasma von Maus (Abb.11/5), Hamster (Abb.11/11) und Mensch (Abb.12/8) eine schwach positive Reaktion aufwies. Durch Anfärbung der Zona pellucida in den Gewebeschnitten konnte morphologisch sehr deutlich die unterschiedliche Schichtdicke der Zona pellucida bei den verschiedenen Spezies gezeigt werden. Bei einigen Spezies (Ratte, Maus und Mensch) wurde eine schwache Reaktion im Bereich der Kumuluszellen, die die Zona pellucida umgeben, beobachtet. Auffallend waren in diesen Gewebeschnitten, ähnlich wie bei AS ZP3-5, sternförmige, immunreaktive Ausläufer, die von der Zona pellucida ausgingen und im Bereich der die Eizelle umgebenden Kumuluszellen nachzuweisen waren.

Die Gewebsspezifität der Antiseren wurde auf Gewebeschnitten anderer Organe der Maus getestet. Untersucht wurden Eileiter, Gebärmutter, Niere, Nebenniere, Leber, Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Milz, Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm. Dabei zeigte sich bei keinem der Antiseren eine Immunreaktion mit Antigen in Gewebeschnitten dieser Organe (nicht gezeigt).



#### 3.4.4 Kontrollexperimente

In weiteren Kontrollexperimenten wurde die Bindung von anti-ZP3 Antikörper an ZP3 Protein durch Zugabe der korrespondierenden Peptide "blockiert", gegen die die Antiseren gerichtet sind. Das Antiserum wurde vor dem Auftragen auf den Gewebeschnitt mit seinem Antigen (synthetisches Peptid) inkubiert.

Als weitere Negativkontrolle wurden die Gewebeschnitte mit dem entsprechenden Präimmuns serum inkubiert.

Wie aus den Abbildungen 11/3, 11/6, 11/9, 11/12, 12/3, 12/6 und 12/9 ersichtlich, war keine Bindung unspezifischer Antikörper an der Zona pellucida detektierbar.

Die Spezifität der gewonnenen Antiseren wurde desweiteren durch Antikörper, die über eine affinitätschromatographische Säule (siehe 3.3.) gereinigt und dann auf den Gewebeschnitten eingesetzt wurden, nachgewiesen. Es zeigte sich hier eine deutlich positive Reaktion affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper mit Zona pellucida 3 Protein in der Zona pellucida (nicht gezeigt). Da sich kein qualitativer oder quantitativer Unterschied in der Immunantwort bei dem Einsatz von affinitätsgereinigten Antikörpern und Antiseren darstellte, wurden in der Regel keine gereinigten Antikörper, sondern Antiseren in den nun folgenden Testsystemen eingesetzt.

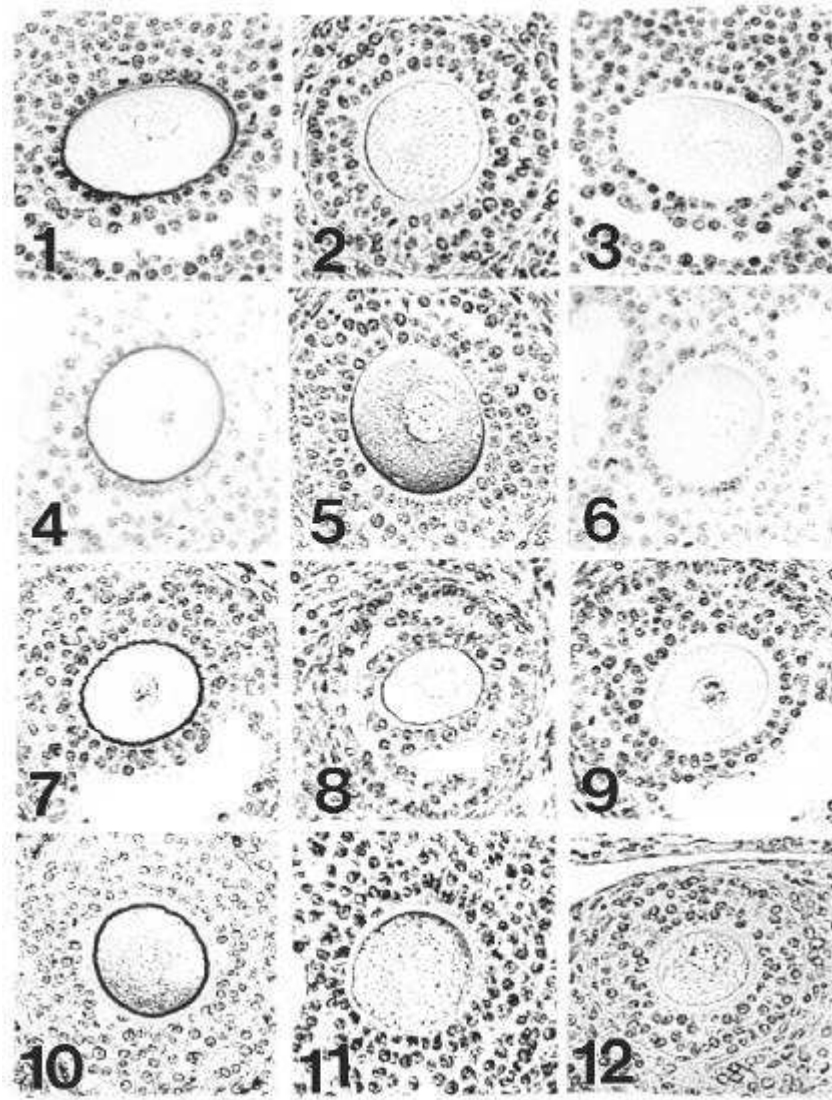


Abb.11

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein in Ovargewebeschnitten verschiedener Säugetierspezies. Dargestellt sind Follikel aus Gewebeschnitten von Maus (1, 3-6), Hamster (2, 10-12) und Ratten Ovarien (7-9). Das Gewebe wurde Methacarn fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden mit AS ZP3-2 (1,2), ZP 3-5 (4, 7, 10) und AS ZP 3-6 (5, 8, 11) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Als Kontrollexperiment erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit Präimmunserum, 1:200 verdünnt (3, 6, 9, 12). Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch das Immun-Peroxidase-System und DAB als Farbreagenz nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt. (Originalvergrößerung x 500)

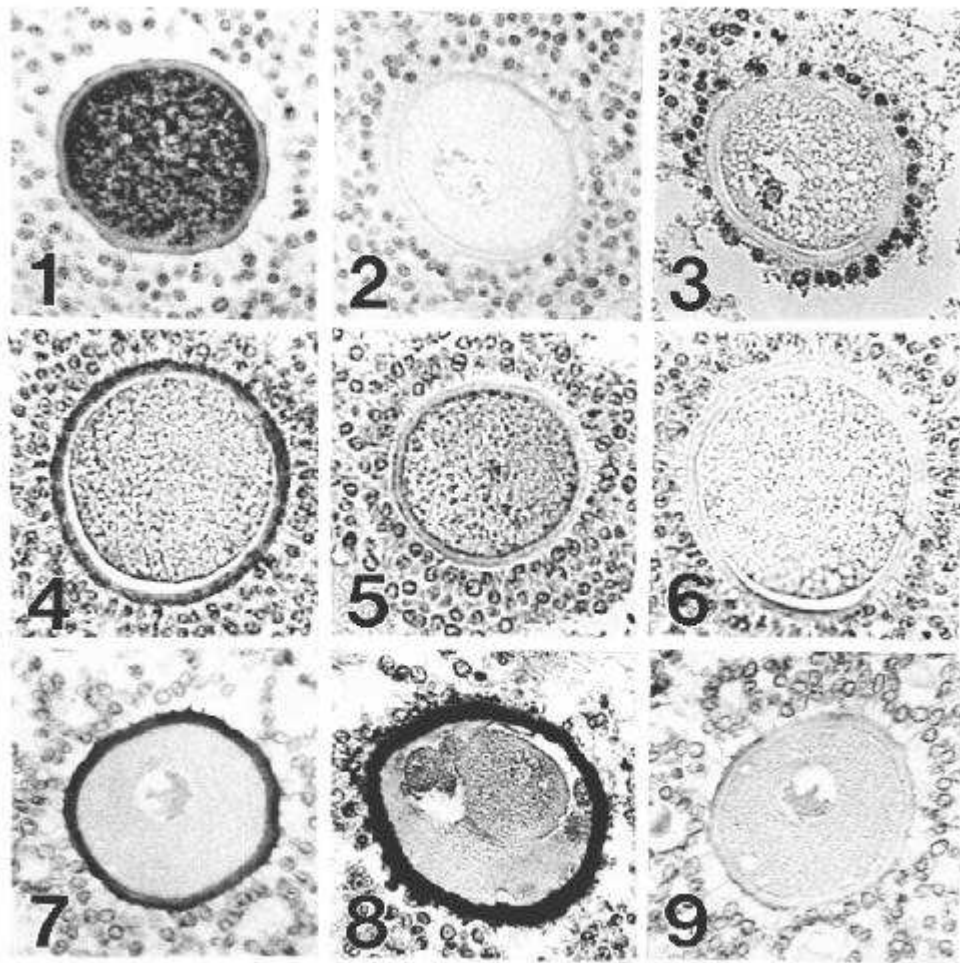


Abb.12

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein in Ovargewebeschnitten verschiedener Säugetierspezies. Dargestellt sind Follikel aus Gewebeschnitten von Schweine (1-3), Rinder (4-6) und Mensch Ovarien (7-9). Das Gewebe wurde Methacarn fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden mit AS ZP 3-5 (1, 4, 7) und AS ZP 3-6 (2, 5, 8) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Als Kontrollexperiment erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit Präimmunserum, 1:200 verdünnt (3, 6, 9). Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch das Immun-Peroxidase-System und DAB als Farbreagenz nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

(Originalvergrößerung x 500)

### **3.5.1 Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae**

Die Bindung von anti ZP3 Antikörpern an das Zona pellucida 3 Protein humaner Hemizonae, die aus Eizellen gewonnen wurden und die nicht mit Spermatozoen in Kontakt gekommen waren, wurde überprüft. Dabei sollte auch die Intaktheit des Proteingerüsts der Hemizonae durch Einsatz von anti ZP3 Antiseren untersucht und die Bindungskapazität der Antikörper an nicht chemisch behandeltes, natives ZP3 Protein evaluiert werden.

In diesem Testsystem wurden gebundene Antikörper durch das Immun Peroxidase System nachgewiesen.

Nach Einsatz von Antiserum AS ZP3-6 zeigte sich eine kräftige Braunfärbung der Hemizona. Der Rand der Hemizona stellte sich zum Vergleich des zentralen Anteils wesentlich stärker gefärbt dar (Abb.13 A). Es war eine deutliche Ringstruktur erkennbar.

Die als interne Kontrolle verwendete korrespondierende Hemizona wurde mit dem entsprechenden Präimmunserum inkubiert. Diese Zona pellucida Hälfte wies eine nur schwache Braunfärbung auf (Abb.13 B).

Nach Applikation des Antiserums AS ZP3-5 kam es im Gegensatz zu AS ZP3-6 nur zu einer unwesentlich stärkeren Braunfärbung der Testhemizona (inkubiert mit AS ZP3-5) verglichen mit der Kontrollhemizona (inkubiert mit Präimmunserum) (nicht gezeigt).

Dieser Befund weist darauf hin, daß die Affinität der AS ZP3-5 Antikörper für das ZP3 Protein zumindest in diesem Testsystem geringer war als AS ZP3-6 Antikörper.

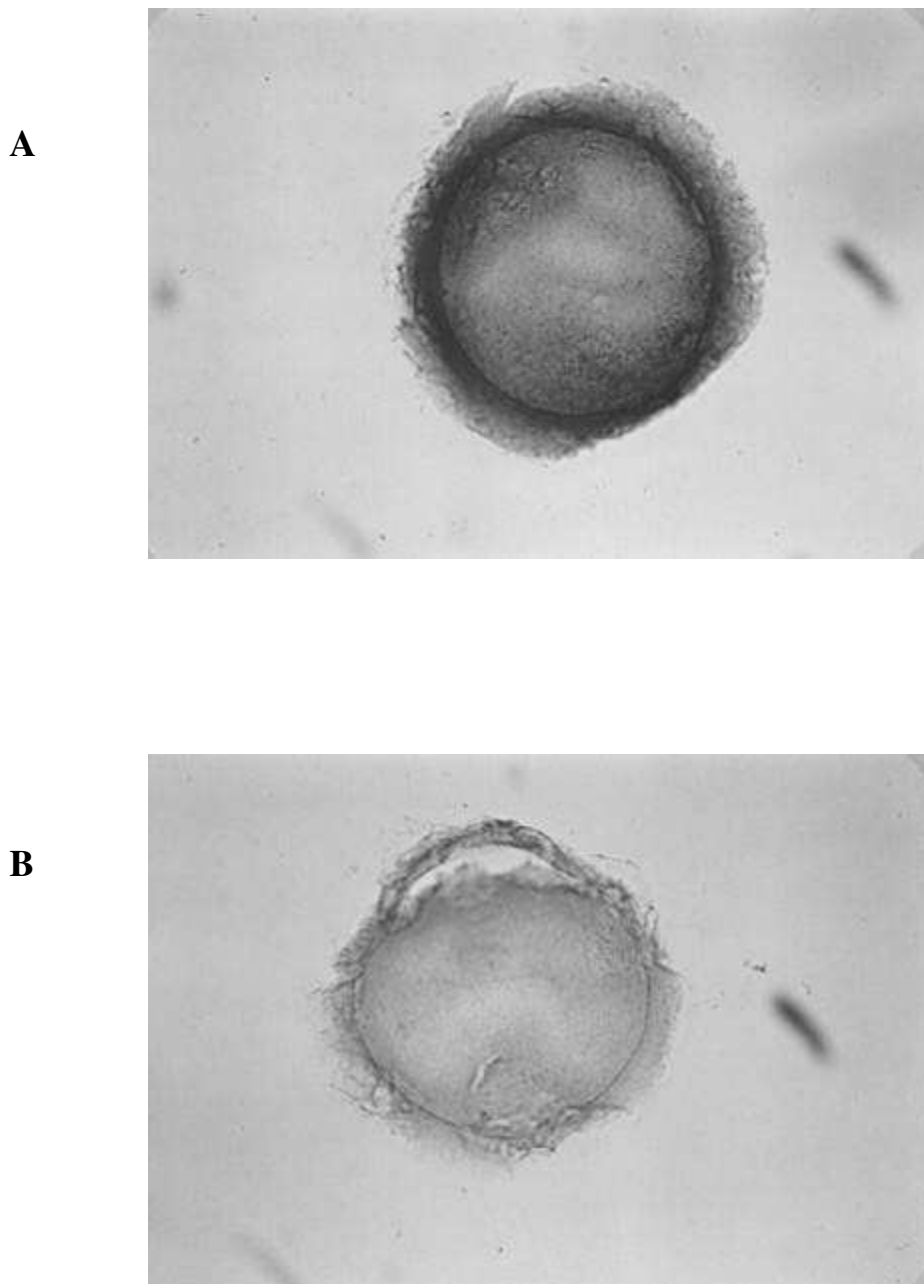


Abb.13

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein an humanen Hemizonae. Die Inkubation der korrespondierenden Hemizona einer Eizelle erfolgte mit Antiserum AS ZP 3-6 (A) bzw. mit dem entsprechenden Präimmunserum (B) (jeweils 1:100 verdünnt). Gebundene anti-ZP3 Antikörper wurden durch anti-Kaninchen-Antikörper, Peroxidase-anti-Peroxidase und Diaminobenzidin als Substrat nachgewiesen. (Originalvergrößerung x 500)

### **3.5.2 Antikörperreaktionen an humanen Hemizonae nach Inkubation mit Spermatozoen**

Zum Einsatz kamen menschliche Hemizonae, die zu klinisch diagnostischen Zwecken im Hemizona Assay am Jones Institut in Norfolk eingesetzt wurden. Als Testzellen dienten Metaphase I oder II Eizellen; die daraus gewonnenen Hemizonae wurden dem Hemizona Assay zugeführt. Eingesetzt wurden Hemizonae, die im Hemizona Assay betreffend der Bindung von Spender Spermatozoen an die Hemizona normwertig waren. Nach Ablauf des Hemizona Assays wurden die Hemizonae und die gebundenen Spermatozoen auf Objektträger fixiert.

Eine Hälfte der Zona pellucida wurde mit Antiserum inkubiert, die korrespondierende Hälfte diente als interne Kontrolle. Diese Hemizonae wurden eingesetzt, um zu überprüfen, ob Unterschiede im Färbeverhalten zu Hemizonae, die nicht mit Spermatozoen inkubiert wurden, festzustellen waren. Die an die Hemizonae gebundenen Spermatozoen waren auch nach Durchlaufen der Färbeprozedur gut erkennbar (Abb.14 A und B).

Eine positive Immunreaktion des Antiserums an der mit AS ZP3-6 inkubierten Hemizona stellte sich durch eine intensive Braunfärbung der Zona pellucida dar. Besonders intensiv angefärbt erschien der ringförmige Rand der Hemizona. Der zentrale Anteil der Hemizona dagegen war in geringerem Ausmaß braun tingiert (Abb.14 A).

Als Negativkontrolle wurde die korrespondierende Hemizona mit dem entsprechenden Präimmunserum inkubiert. Wie erwartet zeigte sich eine nur schwache, ockerfarbene Anfärbung der Hemizona (Abb.14 B).

Hinsichtlich der Bindung von anti ZP3 Antikörpern (gemessen anhand der Intensität der Braunfärbung) an spermatozoenfreie Hemizonae und an Hemizonae nach Durchlaufen des Hemizona Assay war kein Unterschied feststellbar. Nach Inkubation mit dem Antiserum war in beiden experimentellen Ansätzen eine positive Immunreaktion in Form einer starken Braunfärbung nachweisbar. Die jeweils korrespondierenden Kontrollhemizonae zeigten eine nur schwache Anfärbung.

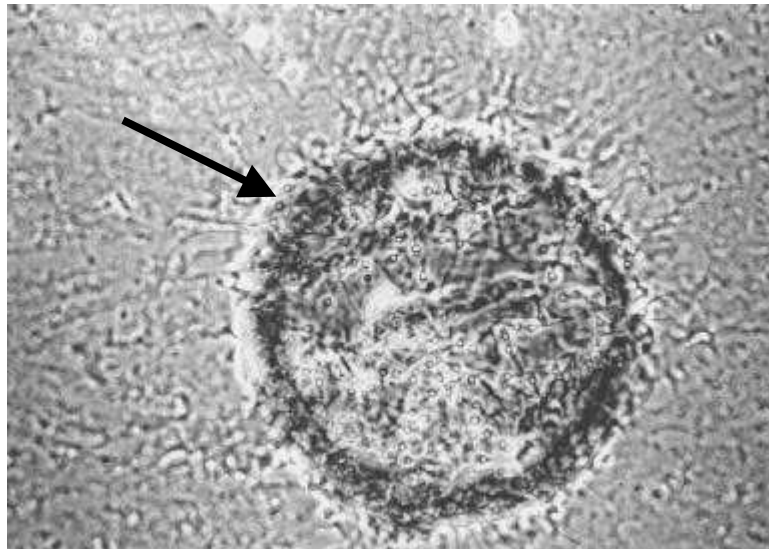
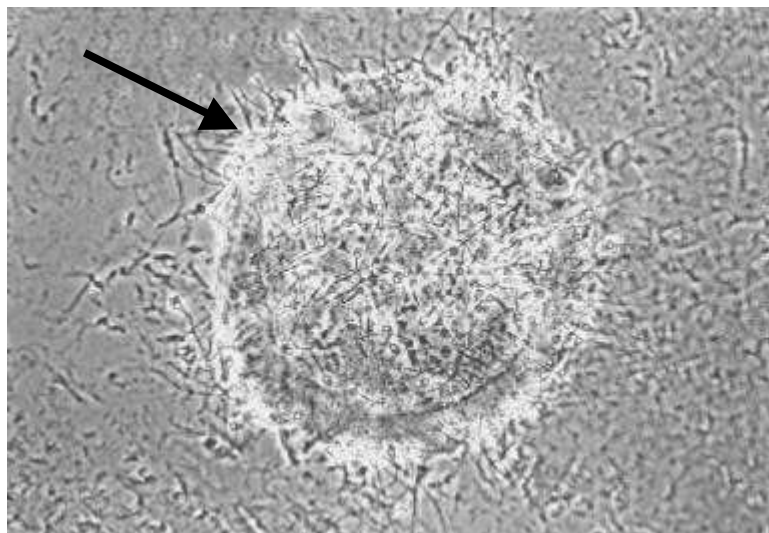
**A****B**

Abb.14

Immunhistochemische Darstellung von ZP3 Protein an humanen Hemizonae nach Hemizona Assays. Die Inkubation der korrespondierenden Hemizona einer Eizelle erfolgte mit Antiserum AS ZP 3-6 (A) bzw. mit dem entsprechenden Präimmunserum (B) (jeweils 1:100 verdünnt). Gebundene anti-ZP3 Antikörper wurden durch anti-Kaninchen-Antikörper, Peroxidase-anti-Peroxidase und Diaminobenzidin als Substrat nachgewiesen. Zahlreiche an die Zona Pellucida gebundene Spermatozoen sind gut erkennbar (Pfeil).

(Originalvergrößerung x 500)

### **3.6 Indirekte Immunfluoreszenz**

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz wurde untersucht, ob die Antiseren natives, nicht denaturiertes Zona pellucida 3 Protein erkennen. Es sollte der Hinweis für die Lokalisation und Zugänglichkeit des Antigens unter nicht denaturierenden Bedingungen erbracht werden. Außerdem sollte die Spezifität der gewonnenen Peptidantiseren überprüft werden.

Bei diesen Experimenten wurden die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 eingesetzt. Die Immunfluoreszenzstudien wurden an isolierten menschlichen Eizellen oder Schweine Eizellen durchgeführt.

Als Negativkontrollen wurden Eizellen mit Präimmunseren in gleicher Verdünnung inkubiert. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Schweineeizellen und menschlichen Eizellen sind in Abbildung 15 A-F dargestellt.

#### **3.6.1 Antiserum AS ZP3-5**

Nach Inkubation der humanen Eizelle mit Antiserum AS ZP3-5 konnte eine intensive Immunfluoreszenzmarkierung der Zona pellucida nachgewiesen werden. Sie zeigte sich als breiter leuchtender Ring am äußeren Rand der Eizelle. Eine wesentlich schwächere Immunfluoreszenz war im Zentrum der Eizelle zu erkennen (Abb.15 A).

Bei Schweine Eizellen stellte sich die Bindung von AS ZP3-5 Antikörpern des Antiserum AS ZP3-5 an die Zona pellucida als ein kräftiger, im Vergleich zur humanen Eizelle etwas schmalerer und besser abgegrenzter fluoreszierender Ring um die Eizelle dar (Abb.15 D). Im Vergleich zu den Eizellen, die mit Präimmunserum (Abb.15 C und F) inkubiert wurden, war die Immunfluoreszenz im inneren Teil der Schweine Eizelle nur geringfügig intensiver; die Zona pellucida wurde durch das Präimmunserum nicht markiert.

Das Zentrum der menschlichen Eizelle erschien im Vergleich zum Präimmunserum relativ intensiv durch AS ZP3-5 angefärbt (Abb. 15 A).



### **3.6.2 Antiserum AS ZP3-6**

Die Inkubation der Eizellen mit Antiserum AS ZP3-6 zeigte ein weniger einheitliches Bindungsmuster. Die Zona pellucida der menschlichen Eizelle erschien als ein äußerst schmaler Ring von intensiver und kontinuierlicher Fluoreszenz (Abb.15 B). Im zentralen Teil der Eizelle war keine Immunfluoreszenz erkennbar.

Bei Schweine Eizellen, die mit AS ZP3-6 inkubiert wurden, stellte sich die Zona pellucida als schmaler leuchtender und scharf begrenzter Ring dar. Hier war aber hauptsächlich der innere Anteil der Zona pellucida (der zur Eizelle hin liegende Teil) intensiv markiert (Abb.15 E). Der zentrale Teil der Zona pellucida wurde nicht oder nur sehr schwach markiert.

### **3.6.3 Negativkontrolle**

Auf den Abbildungen 15 C und 15 F sind Negativkontrollen gezeigt. Dargestellt sind humane und Schweine Eizellen, die unter gleichen Bedingungen wie die Antiseren mit dem entsprechenden Präimmunserum behandelt wurden. Es konnte weder bei der menschlichen Eizelle (Abb.15 C), noch bei der Schweine Eizelle (Abb.15 F) eine wesentliche Fluoreszenzmarkierung und somit keine nennenswerte spezifische Bindung von Antikörpern an die Eizelle nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß Zona pellucida 3 Peptid Antikörper ihr korrespondierendes Antigen im Zona pellucida 3 Protein der jeweiligen Spezies erkannten. Es wurde gezeigt, daß unter dem gewählten experimentellen Design die anti Zona pellucida 3 Antikörper spezifisch auch natives, nicht denaturiertes in der Zona pellucida befindliches ZP3 Protein erkannten.

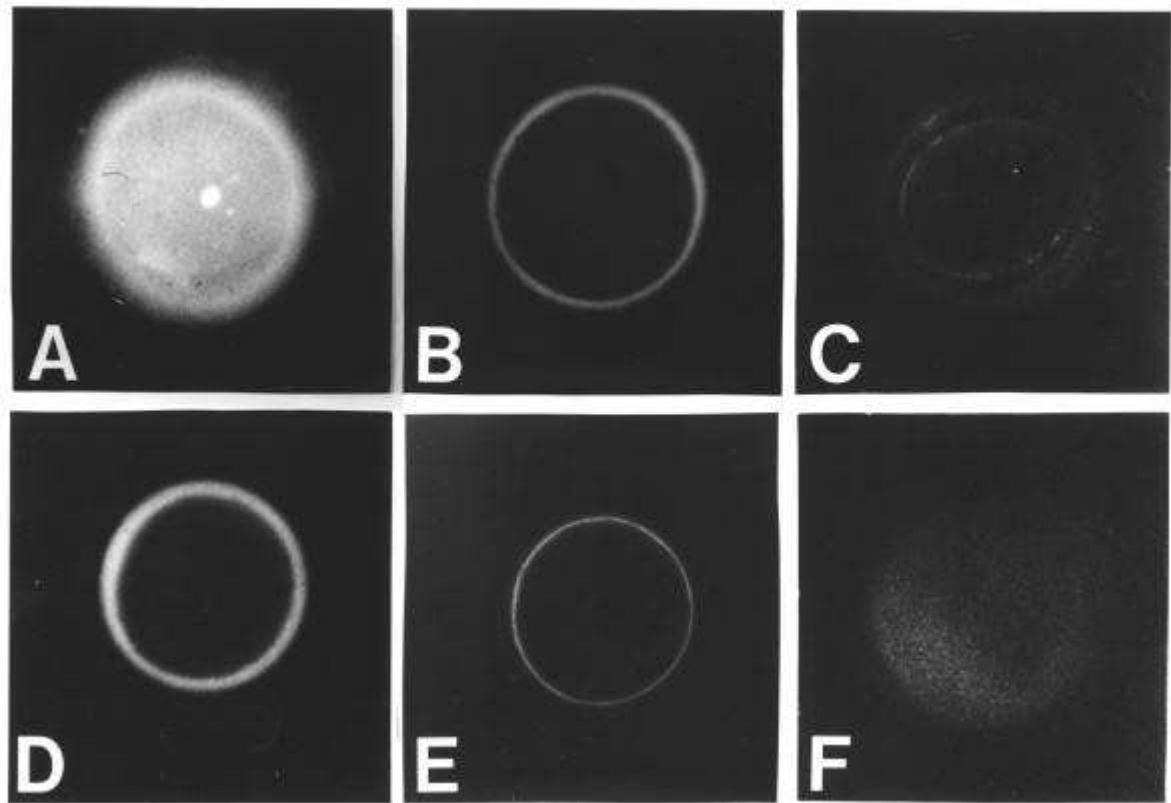


Abb.15 Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung des ZP3-Proteins in humanen und porcinen Eizellen. Humane Eizellen (A-C) und Schweine Eizellen (D-F) wurden mit AS ZP 3-5 (A und D), mit AS ZP 3-6 (B und E) und Präimmunserum (C und F) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Zur Markierung gebundener Antikörper wurden Cy-3 konjugierter anti-Kaninchen IgG (1:600) eingesetzt. (Originalvergrößerung x 500).

### 3.7 Einsatz der Peptidantiseren im Immunoblot und Chemilumineszenzverfahren

Im Immunoblot sollten die Antigene, die die anti ZP3-Peptid Antikörper erkennen, betreffend ihrer apparenten Molekularmassen bestimmt werden. Eingesetzt wurden die Antiseren AS ZP3-5, AS ZP3-6 und AS PO.

Antiserum AS ZP3-6 war unter den gegebenen Immunoblotbedingungen nicht geeignet zur immunbiochemischen Identifizierung seines Antigens. Es zeigte keine Immunreaktivität mit Zona pellucida oder Eizellproteinen im Immunoblot (nicht gezeigt).

Abbildung 16 stellt einen Immunoblot dar, bei dem Antiserum AS ZP3-5 eingesetzt wurde. Dieses Antiserum richtet sich gegen einen ZP3 Sequenzabschnitt, der in Maus, Hamster und Mensch vorkommt.

Abbildung 17 zeigt einen identischen Westernblot, der mit einem polyklonalen Antiserum gegen Schweineoozyten, AS PO, inkubiert wurde. Dieses Antiserum ist gegen isolierte Schweineeizellen gerichtet.

Der sukzessive Einsatz derselben Nitrozellulosemembran mit unterschiedlichen Antiseren ist aufgrund der "Stripping" Methode möglich, bei der gebundene Antikörper von der Nitrozellulosemembran entfernt und ein weiteres Mal mit einem anderen Antiserum behandelt werden.

Auf Spur a und c (Abb.16 und 17) wurden 40 mechanisch isolierte Schweine Zonae pellucidae aufgetragen, auf Spur b und d (Abb.16 und 17) 40 Zona pellucida freie Schweineeizellen. Die Spuren a und b zeigen die aufgetrennten Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, die Spuren c und d unter reduzierenden Bedingungen. Auf den Bahnen e und f (Abb.16 und 17) sind die gereinigten ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Diese beiden Proteine wurden aus Schweine Zona pellucida 3 Protein durch partielle Deglykosylierung gewonnen. Auf der Spur g (Abb.16 und 17) wurde Maus Zona pellucida unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Maus Zonae pellucidae wurden mittels Percoll Gradienten isoliert.

### 3.7.1 Antiserum AS ZP3-5

Antiserum AS ZP3-5 (Abb.16) erkannte in isolierter Schweine Zona pellucida unter nicht reduzierenden Bedingungen eine breite immunreaktive Doppelbande im 220 kDa Bereich (Abb.16, Spur a). Unter reduzierenden Bedingungen waren diese Proteine nicht mehr detektierbar. Hier zeigte sich jedoch eine starke Immunreaktion mit Proteinen im 53 kDa Bereich sowie eine wesentlich schwächere Reaktion mit einem Polypeptid im 70 kDa Bereich (Abb.16, Spur c).

In Zona pellucida freien Schweineeizellen wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durch Antiserum AS ZP3-5 ein Protein erkannt, das ebenfalls eine Molekularmassen von etwa 220 kDa (Abb.16, Spur b) aufwies. Im Vergleich zu isolierter Schweine Zona pellucida stellte sich diese Reaktion etwas weniger intensiv aber stärker fokussiert dar. Zusätzlich war unter diesen Bedingungen eine schwache Bande im 110 kDa Bereich erkennbar (Abb.16, Spur b). Der Ursprung diese Polypeptids ist nicht klar. Möglicherweise stellt dieses Protein ein reduziertes Monomer (110 kDa) des 220 kDa Polypeptids (Dimer) dar.

Ähnlich wie bei isolierter Schweine Zona pellucida unter reduzierenden Bedingungen (Abb.16, Spur c), war bei Zona pellucida freien Schweineeizellen unter reduzierenden Bedingungen das 220 kDa Protein nicht mehr nachweisbar (Abb.16, Spur d); doch konnten wiederum zwei Banden im 70 kDa und 53 kDa Bereich (Abb.16, Spur d) dargestellt werden. Weiterhin war eine schwache Immunreaktion im 110 kDa Bereich (Abb.16, Spur d) wie unter nicht reduzierenden Bedingungen zu zeigen (Abb.16, Spur b).

Auffällig ist, daß das Antiserum AS ZP3-5, weder das gereinigte ZP3 $\alpha$ , noch das gereinigte ZP3 $\beta$  des Schweines im Immunoblot erkannte (Abb.16, Spur e und f).

Wie aus der Abbildung 16, Spur g ersichtlich, zeigte das Antiserum AS ZP3-5 eine starke Immunreaktion mit der Maus Zona pellucida im Molekularmassenbereich zwischen 60 und 90 kDa. Hier wurde eine breite, schlecht fokussierte Bande sichtbar.

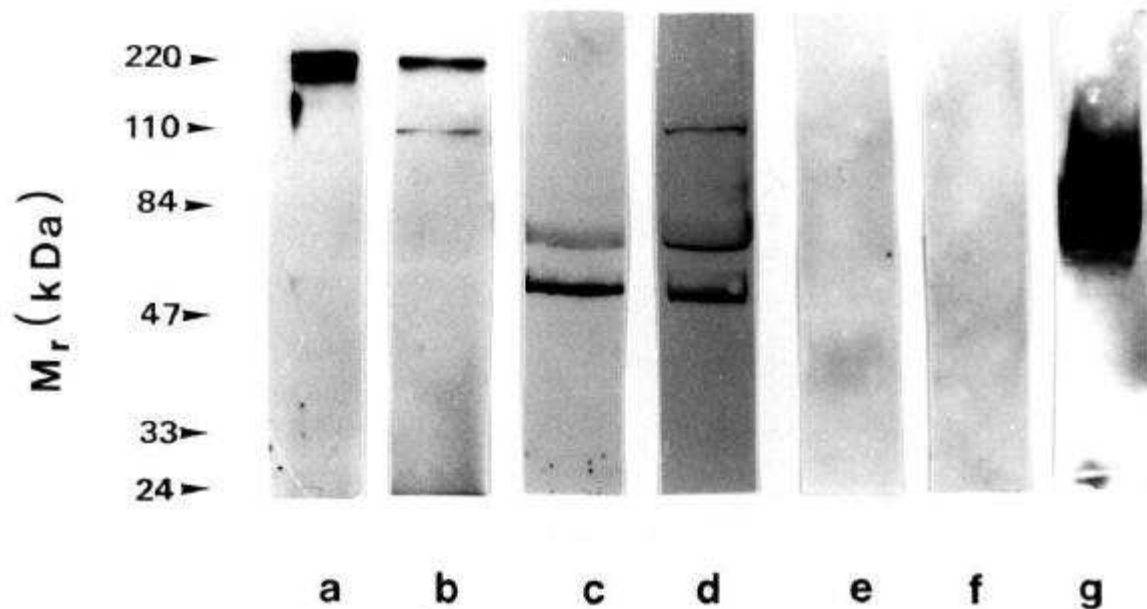


Abb.16 Immunoblot von Schweine Zona pellucida, Zona pellucida freien Schweineeizellen und Maus Zona pellucida. Im Immunoblot wurde das Antiserum AS ZP3-5 (12µg/ml) eingesetzt.

Auf Spur a und c wurden 40 Schweine Zonae pellucidae, auf Spur b und d 40 Zona pellucida freie Schweineeizellen aufgetragen. Spur a und b zeigen aufgetrennte Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, Spur c und d unter reduzierenden Bedingungen. Auf den Spuren e und f sind die gereinigten ZP3α und ZP3β Proteine (1µg/Spur) unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Auf Spur g wurde Maus Zona pellucida (2,5µg/Spur) unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden im Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht.

### 3.7.2 Antiserum AS PO

Das gegen Schweineoozyten gerichtete Antiserum AS PO erkannte sowohl in isolierten Schweine Zonae pellucidae (Abb.17, Spur a) als auch in Zona pellucida freien Schweineeizellen (Abb.17, Spur b) unter nicht reduzierenden Bedingungen Polypeptide von verschiedenen Molekularmassen, unter anderem auch Polypeptide im 220 kDa Bereich (Abb.17, Spur a und b). Diese könnten aufgrund ihrer Laufeigenschaften identisch mit denen sein, die unter nicht reduzierenden Bedingungen sowohl von Schweine Zona pellucida, als auch von Zona pellucida freien Schweineeizellen von AS ZP3-5 (Abb.16, Spur a und b) erkannt wurden. Desweiteren war eine deutliche Reaktion im 53 kDa Bereich (Abb.17 Spur a und b) nachweisbar. Unter reduzierenden Bedingungen konnten wieder ähnliche Ergebnisse im Proteinbandenmuster zwischen isolierter Schweine Zona pellucida (Abb.17, Spur c) und Zona pellucida freien Schweineeizellen (Abb.17, Spur d) gezeigt werden. Es fanden sich Polypeptide im Molekularmassenbereich von 100 kDa, 75 kDa, 70 kDa und 53 kDa. Die quantitativ größte Menge immunreaktiven Materials war im 70 kDa Bereich zu erkennen. Eine wesentlich schwächere Reaktion trat im Bereich von 53 kDa auf. Diese beiden Proteine könnten identisch mit den durch Antiserum AS ZP3-5 nachgewiesenen Polypeptiden sein (Abb.16, Spur c und d). Die unterschiedliche Intensität der Reaktion macht deutlich, daß die beiden getesteten Antiseren zwar verschiedene Affinitäten zum Antigen besitzen, aber aufgrund der identischen Molekularmassen der erkannten Proteine möglicherweise das gleiche Antigen erkennen. Das Antiserum AS PO zeigte im Vergleich mit dem Antiserum AS ZP3-5 eine Immunreaktion mit gereinigtem ZP3 $\alpha$  als auch mit ZP3 $\beta$  (Abb.17, Spur e und f). Diese Reaktion stellte sich als eine breite und schlecht fokussierte Bande im Molekularmassenbereich von etwa 40 kDa dar. In der Zona pellucida der Maus konnte mit AS PO ebenfalls eine breite, aber ausgesprochen schwach markierte Proteinbande zwischen 60 und 90 kDa nachgewiesen werden (Abb.17, Spur g). Die Intensität der Markierung war wesentlich geringer als die von Antiserum AS ZP3-5 und ist auf der Abbildung kaum sichtbar. Es sollte noch darauf hingewiesen werden, daß die Ergebnisse im Immunoblot nicht immer übereinstimmend waren. Unterschiedliche Gel Systeme (7,5% und 10%ige) führten zu

unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten bestimmter Polypeptide oder auch zu Differenzen im Fokussierungsgrad einiger Proteinbanden (nicht gezeigt). Eine weitere Variable, die möglicherweise zu unterschiedlichen Ergebnissen führte, könnten auch der Reifegrad der Eizellen oder das Alter der geschlachteten Tiere gewesen sein.

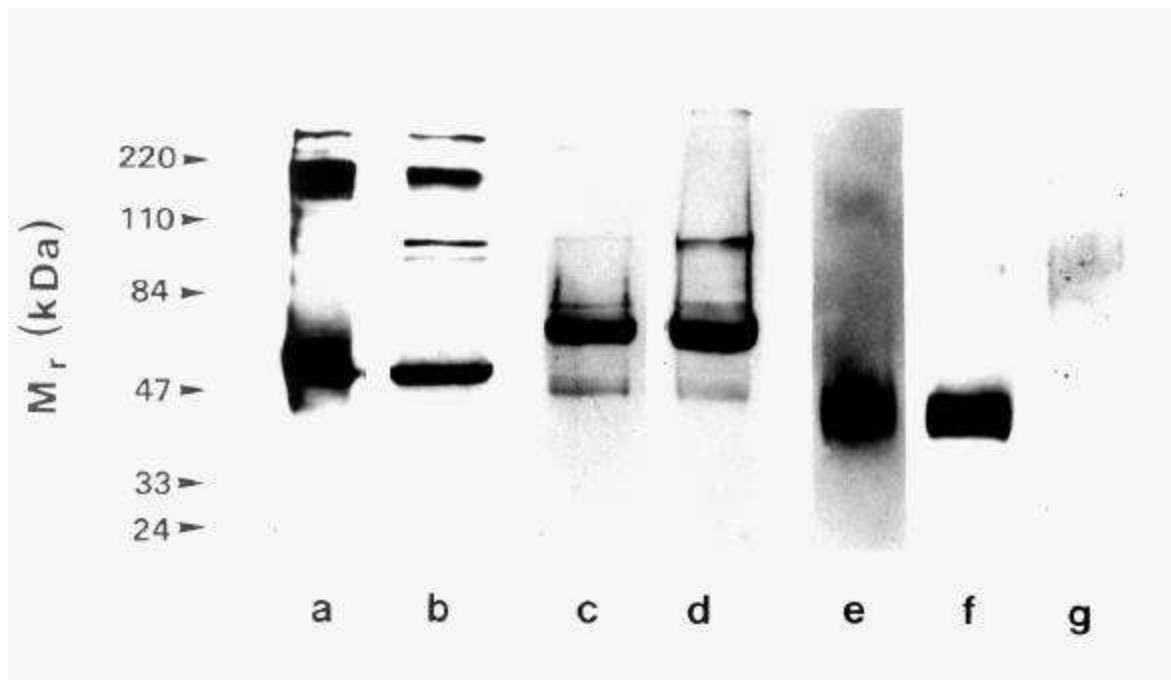


Abb.17 Immunoblot von Schweine Zona pellucida, Zona pellucida freien Schweine-eizellen und Maus Zona pellucida. Im Immunoblot wurde das Antiserum AS PO (12 µg/ml) eingesetzt. Auf Spur a und c wurden 40 Schweine Zonae pellucidae, auf Spur b und d 40 Zona pellucida freie Schweineeizellen aufgetragen. Spur a und b zeigen aufgetrennte Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen, Spur c und d unter reduzierenden Bedingungen. Auf den Spuren e und f sind die gereinigten ZP3α und ZP3β Proteine (1µg/Spur) unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. Auf Spur g wurde Maus Zona pellucida (2,5µg/Spur) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden im Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht.

## 4 Diskussion

Das Ziel der Dissertationsarbeit war, Antikörper gegen definierte Epitope der Zona pellucida 3 Proteine herzustellen und zu charakterisieren.

Zum Nachweis von Zona pellucida Protein in Ovarien unterschiedlicher Säugetierspezies wurden Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt. Als Antigene dienten an Trägerprotein gekoppelte synthetischen Zona pellucida 3 Peptide. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte Zona pellucida 3 Protein in den Zonae pellucidae verschiedener Spezies nachgewiesen werden.

Als Antigene bieten synthetische Peptide gegenüber gereinigten Zona pellucida Proteinen verschiedene Vorteile:

- Im Gegensatz zu Antikörpern gegen mit biochemischen Methoden gereinigte Proteine zeigen Antiseren gegen definierte synthetische Peptide in der Regel nur Antigen-Antikörper-Reaktionen gegen das eingesetzte Peptid.
- Antikörper gegen synthetische Peptide aus hochkonservierten ZP Protein Epitopen können Zona pellucida Proteine von Spezies detektieren, die bisher noch nicht als biochemisch gereinigtes Protein vorliegen oder deren cDNA noch nicht mit gentechnologischen Methoden isoliert worden sind.
- Antikörper gegen synthetische Peptide erkennen einzelne, definierte Epitope, wogegen Antikörper gegen das Gesamtprotein eine Fülle von Epitopen erkennen. Es können damit Aussagen über die physiologische Bedeutung einer bestimmten linearen Proteindomäne gemacht werden. Eine solche Spezifität gegenüber bestimmten Epitopen könnte theoretisch nur mit monoklonalen Antikörpern erreicht werden. Hier sind jedoch die Epitope, die von den jeweiligen Klonen detektiert werden, nicht vorhersagbar.
- Eine Herstellung von synthetischen Peptiden mit einem sehr hohen Reinheitsgrad ist mit einem relativ geringen Arbeitsaufwand reproduzierbar möglich; sie können in größeren Mengen synthetisiert werden.
- Fast alle der bisher beschriebenen polyklonalen Antiseren gegen gereinigte Zona pellucida Proteine erkennen mehrere, meist nicht näher definierte Epitope. Auch bei Einsatz hoch angereicherter Protein-Präparationen kann eine Kontamination mit anderen Zona pellucida Proteinen oder mit Eizell- bzw. Kumuluszell-Proteinen und damit einhergehende unerwünschte Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden.

Die Antiseren, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind gegen definierte Epitope des ZP3 Proteins gerichtet und wurden in Kaninchen gewonnen. Als Immunogene dienten



synthetische Peptide aus den bekannten ZP3 Aminosäuresequenzen. Die Antikörpertiter von je 3 Kaninchen pro Peptid wurden im ELISA bestimmt. Die Titerverläufe wiesen zeitabhängig nach Immunisierung und Boosterung ansteigende Werte auf. Keines der Antiseren kreuzreagierte mit anderen synthetischen Peptiden, was die hohe Spezifität der Antikörper für das detektierte Epitop unterstreicht; somit waren wichtige Voraussetzungen für die Generierung speziesspezifischer anti Zona pellucida Protein Antikörper gegeben. Desweiteren zeigte sich, daß trotz identischem Immunisierungsprotokoll quantitative und qualitative Unterschiede in der Antikörperproduktion individueller Tiere aufzuweisen waren. Dieses Phänomen deutete darauf hin, daß die Antigenprozessierung und eine entsprechende Immunantwort in jedem Tier unterschiedlich sein kann. So wurde im Rahmen der Herstellung geeigneter Antiseren beobachtet, daß trotz mehrerer Auffrischungen in manchen Kaninchen keine Antikörper gegen das Antigen generiert werden konnten. Andererseits erkannten bestimmte Antiseren zwar das als Antigen eingesetzte synthetische Peptid, aber nicht das entsprechende Zona pellucida Protein. Auffällig war in diesem Zusammenhang auch eine interindividuell variierende Qualität der produzierten Antikörper: Kaninchen, die mit dem identischen synthetischen Peptid unter gleichen Bedingungen immunisiert wurden, generierten offensichtlich Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des synthetischen Peptids. Es ist somit nicht allein die Auswahl der Aminosäuresequenz von Bedeutung, sondern auch die Prozessierung und Präsentation des Antigens sowie die Generierung von Antikörpern durch das Versuchstier.

Trotz identischer Behandlung der Kaninchen mit den gleichen Antigenen kann die Immunantwort also ganz individuell verlaufen. Diese Feststellung konnte auch schon bei der Gewinnung von Antikörpern gegen synthetische Peptide aus anderen Proteinen, z.B. G-Proteine, gemacht werden (Hinsch et al., 1992). Es handelt sich hier also um eine Variable, die vom Experimentator nicht beeinflußt werden kann. Da Vor- und Nachteile der Immunkontrazeption mit Zona pellucida Antigenen in der Literatur Zeit ausgiebig diskutiert werden (Dunbar et al., 1993; Jones, 1994; Sacco et al., 1994, Afzalpurkar und Gupta 1997, Zhang et al., 1997), kann diese Beobachtung in Hinblick auf die Entwicklung einer Zona pellucida-Vaccine erhebliche Bedeutung haben. Generell wird von einem Kontrazeptivum eine sichere, vom Wirkmechanismus aus gesehene nachvollziehbare immunologische oder pharmakologische Wirkung erwartet. Eine immunologische Kontrazeption ist nur dann sinnvoll, wenn eine gesicherte und zielgerichtete Antikörperproduktion gewährleistet ist. Wie in diesen Untersuchungen im Kaninchen gezeigt, so berichteten ebenfalls Lou et al., (1995) im Maus-Modell und Paterson et al. (1996) bei Marmoset-Affen, daß nicht alle mit

identischen ZP3-Peptiden immunisierten Tiere mit einer Antikörperproduktion auf die Peptide reagierten und nicht in jedem Fall ein Antikörpertiter erreicht wurde, der die Fertilität signifikant und dauerhaft zuverlässig herabsetzte. Eine große interindividuelle Streubreite betreffend der Antikörperproduktion und der Antigenprozessierung könnte einen immunkontrazeptiven Ansatz mit ZP-Antigenen grundsätzlich in Frage stellen. Desweiteren zeigten mehrere Studien an Tiermodellen, daß eine vollständige Reversibilität einer Immunkontrazeption nur erreicht wurde, wenn Peptidvaccine eingesetzt wurden, die ausschließlich aus B-Zell-Epitopen bestanden (Epifano und Dean, 1994; Jones, 1994). T-Zell-Epitope induzierten eine zelluläre Immunantwort, die zu einer destruktiven Entzündung des Ovars führte und dies irreversibel schädigte (Lou et al., 1996).

Aufgrund eventuell in Immunseren vorhandenen unspezifischen Antikörpern, die an die Zona pellucida binden, könnten falsch positive Ergebnisse erzielt werden. Um reproduzierbare, valide Untersuchungen zu gewährleisten, wurden erfolgreich affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper gewonnen und bei Bedarf in den Testsystemen eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden erstmals Antikörper gegen definierte, in verschiedenen Spezies homologe ZP3 Epitope hergestellt und immunhistochemisch charakterisiert. Durch den Einsatz von Antiseren gegen Domänen, die in allen bisher sequenzierten ZP3 Proteinen vorkommen, konnte auch ZP3 Protein in der Eizelle von Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenz (d.h. cDNA) zum Zeitpunkt der Antikörperherstellung noch nicht mit immunologischen Methoden bekannt war, dargestellt werden.

Die anti ZP3-Peptid-Antiseren reagierten in Ovarschnitten mit Zona pellucida Protein. Diese Ergebnisse zeigten, daß Antikörper gegen relativ kurze synthetische Peptidsequenzen auch Zona pellucida Protein erkannten. Antikörper, die gegen homologe Aminosäuresequenzen gerichtet waren (AS ZP3-6, AS ZP3-5), detektierten immunhistochemisch Zona pellucida Protein in Spezies, deren ZP3-Aminosäuresequenzen seinerseits nicht bekannt waren. Die Arbeitshypothese, daß homologe Aminosäuresequenzen von Zona pellucida-Proteinen auch in Zonae pellucidae von Spezies, deren Zona pellucida Aminosäuresequenzen noch nicht bekannt sind, vorkommen, konnte erstmals experimentell nachgewiesen werden.

Die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 reagierten mit ihrem Antigen in Zonae pellucidae aller getesteter Spezies. Im Anfärbemuster konnten jedoch deutliche speziesspezifische

Unterschiede beobachtet werden: In menschlichen Oozyten konnte z.B. eine starke Anfärbung der Zona pellucida mit dem Antiserum AS ZP3-6 beobachtet werden, wogegen die Reaktion mit AS ZP3-5 weniger stark ausfiel. Andererseits haben Antikörper des Antiserums AS ZP3-5 besonders stark an boviner Zona pellucida und an antigenem Material in Schweineooplasma gebunden; in beiden Fällen gab es jedoch keine Reaktion von Antiserum AS ZP3-6 Antikörpern mit immunreaktiven Proteinen dieser Zellen. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnten speziesspezifische Unterschiede in der Glykosylierung der Zona pellucida Proteine sein. Durch eine sterische Behinderung von Zuckerketten an den Epitopen oder an epitopnahen Bereichen könnte eine Antikörperbindung beeinträchtigt werden. Andererseits könnte die unterschiedliche immunhistochemische Anfärbbarkeit auch auf speziesspezifische Unterschiede im Aufbau des Zona pellucida Netzwerkes zurückzuführen sein. Es ist weiterhin vorstellbar, daß bestimmte antigene Epitope des ZP3-Proteins je nach Spezies unterschiedlich stark exponiert werden. Somit könnte es zu einer Maskierung von Epitopen und damit zu von einander abweichenden Anfärbemustern kommen. Andererseits könnten auch noch nicht vollzogene posttranslationale Modifikationen des Schweine ZP3 Proteins im Ooplasma und die damit bessere Zugänglichkeit für die Antikörper eine Rolle für diese Beobachtung spielen. Anti-Peptid Antikörper sind gegen kontinuierliche Aminosäuresequenzen des ZP3 Proteins gerichtet und erkennen somit keine glykosylierten Bestandteile der Zona pellucida. Aus diesem Grund könnte die Affinität von Antikörpern gegen lineare Epitope für intrazelluläre, nicht glykosylierte Antigene wesentlich höher sein als für im Netzwerk integrierte und posttranslational modifizierte Proteine. Die starke Immunreaktivität in Schweineoozytenzytoplasma wäre mit einer erhöhten Synthese und Transport von ZP3 Protein während der Oogenese zu erklären. In fast allen Oozyten verschiedener Spezies, insbesondere in denen von Schweinen, wurde antigenes Material im Ooplasma detektiert. Diese Resultate stehen im Einklang mit den Experimenten von Takagi et al. (1989), in denen ein monoklonaler Antikörper gegen Schweine Zona pellucida Proteine eingesetzt wurde. Auch hier konnte immunreaktives Material sowohl in der Zona pellucida als auch im Zytoplasma von Schweineoozyten immunhistochemisch dargestellt werden. Ebenso wurde von Dunbar et al. (1994) bei Schwein und beim Menschen Zona pellucida Material im Ooplasma lokalisiert.

In Ovarschnitten von Ratte, Rind, und Mensch wurden durch Antikörper gegen ZP3-Protein ausläuferartige Strukturen der Zonae pellucidae in das umliegende Kumulusgewebe beobachtet. Zwei in der Literatur kontrovers diskutierte Gründe für Zona pellucida Proteine außerhalb der Eizelle könnten diese Beobachtung erklären. Bei der Maus konnte mit gentechnologischen Methoden eindeutig nachgewiesen werden, daß zumindest ZP3-Protein ausschließlich in der Eizelle und in keinem anderen Gewebe exprimiert wird (Bleil und Wassarman, 1980a; Bleil und Wassarman, 1980b). Analog wurde von Shimizu et al. (1983) die Oozyte als alleiniger Ursprungsort der Zona pellucida angenommen. Es könnte sich somit bei diesen Strukturen um Zona pellucida Proteine oder um deren Abbauprodukte handeln, die in der Umgebung der Eizelle zu liegen kommen und/oder von den Kumuluszellen aufgenommen werden. In anderen Spezies als der Maus wurde aber auch gezeigt, daß Kumulus- und Granulosazellen Zona pellucida Proteine de novo synthetisieren. Im Kaninchenmodell konnte nachgewiesen werden, daß Zona pellucida Proteine auch in Kumuluszellen in vitro transkribiert, translatiert und sezerniert werden (Lee und Dunbar, 1993; Wolgemuth et al., 1984). Grootenhuys et al. (1996) lokalisierten ZP3-Moleküle in den Granulosazellen von Kaninchen, Marmoset- und Rhesusaffen sowie vom Menschen und vermuteten einen Zusammenhang mit der Destruktion der Ovarien nach aktiver Immunisierung mit Zona pellucida Proteinen. Neuere Untersuchungen von Totzauer et al., 1998, wiesen mittels polyklonaler Antikörper ZPB und ZPC in bovinen foetalen Ovar- wie auch Follikelzellen nach. Die Autoren folgerten daraus, daß beide, Eizelle und Follikelzelle, an der Bildung der Zona pellucida beteiligt sind.

Durch die immunhistochemischen Untersuchungen konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß Antikörper, die gegen Maus-ZP3-Aminosäuresequenzen gerichtet sind (AS ZP3-2), ausschließlich murines ZP3 erkennen und keine Kreuzreaktionen gegen ZP3-Proteine anderer Spezies aufwiesen. Antiseren, die gegen synthetische ZP3-Peptide gerichtet waren, zeigten ein auffälliges bilamelläres Färbungsmuster der menschlichen und der Maus Zona pellucida. Die Bedeutung dieses mehrschichtigen Aufbaus der Zona pellucida ist bisher noch nicht geklärt. Einerseits ist die Entstehung dieses Phänomens durch Artefakte während der Präparation des Gewebes nicht auszuschließen. Andererseits könnte es sich bei der Zona pellucida auch um eine hoch organisierte extrazelluläre Matrix handeln, die von der Eizelle und/oder ihren umgebenden Zellen synthetisiert wird, und deren unterschiedlichen Schichten verschiedene Funktionen zuzuordnen sind. In vorangegangenen Arbeiten wurde berichtet, daß die Zona pellucida der Kaninchen Eizelle aus mehreren Schichten besteht, die auch

unterschiedliche physikalische und biochemische Eigenschaften besitzen (Dunbar et al., 1991; Dunbar et al., 1994).

Eine weitere Rolle von Zona pellucida Proteinen, die in die Kumulusmassen hineinreichen, könnte sein, daß diese Ausläufer die Kumulusmasse an sich stabilisieren. Rankin und Mitarbeiter (1996) haben berichtet, daß eine Insertionsmutation des ZP3-Gens der Maus einen totalen Verlust der Zona pellucida Matrix zur Folge hat. Das Fehlen der Zona pellucida geht bei Mäusen mit der Desorganisation des Kumulus Oophorus einher. In dieser Arbeit wurde diskutiert, daß die Abwesenheit der Zona pellucida Matrix dazu führen könnte, daß die Corona radiata Zellen nicht mehr zusammengehalten werden; dieses sei dann der Grund für die fehlende Organisation des Kumulus Oophorus bei diesen Tieren.

Mit den in der hier vorgelegten Arbeit beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen Aminosäuresequenzen, die nur im Maus ZP3 Protein vorkommen, ausschließlich murines ZP3 erkennen und keine Kreuzreaktionen gegen Zona pellucida Protein anderer Spezies nachzuweisen waren. Die These, daß homologe Aminosäuresequenzen des ZP3 Proteins auch in Zonae pellucidae von Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenz noch nicht bekannt ist, vorkommen, konnte erstmals experimentell belegt werden.

Es ist davon auszugehen, daß während der Aufbereitung und Fixierung des Gewebes sowie bei der Herstellung von Paraffinschnitten ZP3 Protein chemisch modifiziert wird und somit eventuell "in vivo" nicht zugängliche Epitope freigelegt werden und nur so von den Antikörpern detektiert werden können. Deshalb war es von großer Bedeutung, zu untersuchen, ob auch nicht chemisch modifiziertes ZP3 Protein durch die Antiseren erkannt wird.

Aus diesem Grunde wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien mit nicht behandelten, frischen menschlichen Eizellen und Schweineeizellen durchgeführt. Analog zu den immunhisto-chemischen Untersuchungen mit chemisch modifiziertem Gewebe waren auch in der Immunfluoreszenz unterschiedliche Färbeverhalten zwischen Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6 sowie auch speziesspezifische Unterschiede im Anfärbungsmuster festzustellen. Antiserum AS ZP3-5 zeigte eine starke Immunfluoreszenzmarkierung der menschlichen Zona pellucida am äußeren Rand der Eizelle. Eine schwächere Fluoreszenz konnte im inneren

Bereich der Oozyte festgestellt werden. Vergleich man das Färbeverhalten dieses Antiserums mit den Schweineoozyten, so zeigte sich hier die Zona pellucida als etwas schmalerer und besser abgegrenzter Ring im Vergleich zur menschlichen Eizelle. Im Zentrum der Eizelle konnte hier keine wesentliche Fluoreszenz gezeigt werden.

Untersuchungen mit dem Antiserum AS ZP3-6 wiesen eine weniger uniforme Immunfluoreszenz auf. In menschlichen Oozyten ließ sich ein Ring intensiver und homogener Anfärbung durch die gesamte Zona pellucida nachweisen; im zentralen Anteil der Oozyte war keine Immunfluoreszenz sichtbar. Das ZP3-6 Epitop der Schweine Zona pellucida wurde dagegen als schmaler und scharfer Ring am inneren Anteil der Zona pellucida erkannt.

Ähnliche Resultate mit polyklonalen Antiseren gegen Zona pellucida des Schweines wurden in anderen Untersuchungen beschrieben (Dunbar und Raynor, 1980). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Antiseren, die gegen mit Detergens solubilisierter porciner Zona pellucida gerichtet sind, eine eher uniforme Fluoreszenz der Schweine Zone pellucida aufwiesen. Antikörper gegen intakte oder hitzebehandelte Zona pellucida zeigten eine wesentlich stärkere Fluoreszenz am äußeren Ende der Zona pellucida. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluß zu, daß die Behandlung von Zona pellucida mit Detergens immunogene Epitope verändert haben könnte und somit die unterschiedliche Färbemuster zu erklären sind. Diese Untersuchungen unterstützen die oben diskutierte Annahme, daß die Erreichbarkeit des Antigens für die Antikörper abhängig von der Maskierung bzw. Demaskierung bestimmter Epitope sein kann.

Ein weiterer Nachweis der Bindung von anti ZP3 Peptidantikörpern erfolgte mittels an Objektträger gebundene humane Hemizona pellucida. Der Einsatz von Hemizonae und der Hemizona Antikörper Bindungstest wurden aus zwei verschiedenen Gründen aufgebaut:

1. Methodische Gründe: Anhand der Untersuchungen mit der Immunfluoreszenztechnik zeigte sich, daß im Einzelfall sowohl humane Eizellen als auch Schweineeizellen unterschiedlich intensive Antikörperbindungsverhalten aufwiesen. So fand sich in den meisten Eizellen zwar das gleiche qualitative Anfärbungsmuster, jedoch war die Stärke der Immunfluoreszenz häufig sehr unterschiedlich. Aus diesem Grunde war es notwendig, durch

die Herstellung gleich großer Hemizonae aus einer Eizelle eine interne Negativkontrolle in das experimentelle Design einzubauen. Somit konnten z.B. zwei verschiedene Seren, wie z.B. Präimmunserum und das zu testende Antiserum eingesetzt werden und direkt miteinander verglichen werden.

2. Unter Einsatz einer internen Negativkontrolle sollte überprüft werden, ob es zu unterschiedlichen Anfärbungsmustern vor und nach Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida kommt.

Es wurden Hemizonae untersucht, die zur klinischen Diagnostik im Hemizona Assay eingesetzt wurden. Der Hemizona Assay wurde von Burkmann et al. 1988 für das menschliche System entwickelt und ermöglicht, das Bindungsverhalten von Spermatozoen eines Patienten mit dem von Spermatozoen eines gesichert fertilen Spenders zu vergleichen. Dabei wird eine Hemizona pellucida mit dem Patientenejakulat, die korrespondierende Hälfte mit dem Spenderejakulat inkubiert. Abschließend wird die Anzahl der gebundenen Spermatozoen ausgezählt und somit geprüft, ob das Bindungsverhalten der Patientenspermatozoen dem der Spenderspermatozoen entspricht.

Eingesetzt wurden Eizellen mit vergleichbaren Reifestadien. In den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß nach Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida keine wesentliche Veränderung des Antikörperbindungsmusters festzustellen war. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß es nach Bindung von Spermatozoen an die Zona pellucida sehr wahrscheinlich zu keinen wesentlichen strukturellen Veränderungen oder Umverteilungen des durch das Antiserum AS ZP3-6 erkannten Epitops kommt. Nach Induktion der akrosomalen Reaktion an der Zona pellucida gebundener Spermatozoen könnte es durchaus durch die im Akrosom befindlichen Enzyme zu Veränderungen der Zona pellucida Struktur kommen. Das Bindungsverhalten der untersuchten ZP3 Antikörper wurde aber offensichtlich nicht verändert. Diese Befunde könnten implizieren, daß die identifizierten ZP3 Epitope keine Domäne beinhalten, die für die Wirkung von für die akrosomale Enzyme wichtigen Bereiche von Bedeutung sind.

Die Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die immunhistochemischen Befunde betreffend der unterschiedlichen Qualität der Antigene mit den Ergebnissen des Hemizona-Antikörper-

Bindungsassays übereinstimmen. Das Antiserum AS ZP3-5, das im Ovar immunhistochemisch nur schwach an die menschliche Zona pellucida gebunden hatte, zeigte auch im Hemizona Antikörper Bindungstest nur einen geringgradig stärkeren Anfärungsgrad verglichen mit seiner internen Negativkontrolle.

Das Antiserum AS ZP3-6 hingegen, das auch in menschlichen Ovarschnitten sehr intensiv die Zona pellucida erkannte, reagierte intensiv mit menschlichen Hemizonen. Die Affinität der ZP3 Antikörper wie auch die Zugänglichkeit der durch sie erkannten Epitope ist sowohl unter chemisch modifizierten als auch unter die Zona pellucida Struktur relativ gut erhaltenden Bedingungen weitgehend stabil.

Im Hemizona-Antikörper-Bindungstest zeigte sich bei den meisten Antiseren, daß die Hemizonen insbesondere im Randbereich intensiv angefärbt waren und sich das Zentrum schwächer angefärbt darstellte. Dieses differenzierte Bindungsverhalten könnte dadurch entstehen, daß antigene Epitope im Schnittbereich der Zonen pellucidae besonders stark erkannt werden können. Bedingt durch die mechanische Manipulation könnte es zu einer Desintegration des Zona pellucida Netzwerkes und zur Demaskierung antigenen Epitope kommen. Allerdings wäre in diesem Zusammenhang auch ein rein optisches Phänomen zu diskutieren, das durch Projektionen der halbkugelig auf Objektträgern angetrockneten Hemizonen entsteht. Überlagerungseffekte oder Summationsphänomene könnten ursächlich für diese Beobachtung verantwortlich sein.

Für die immunbiochemischen Charakterisierungen der anti Zona pellucida Antiseren und die Identifizierung von ZP3-Protein in Proteingemischen wurden Immunoblots durchgeführt. Generell ist festzustellen, daß Zona pellucida Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Glykosylierungsmuster auf Polyacrylamid-Gelen eine starke Heterogenität betreffend ihrer Laufeigenschaften zeigen (Epifano et al., 1994). Zona pellucida Glykoproteine stellen sich in vielen Spezies als breite, schlecht fokussierte Banden dar. Deshalb ist es in der Regel sehr problematisch, Zona pellucida Proteine aufgrund ihrer apparenten Molekularmassen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese exakt zu definieren (Dunbar et al., 1981).

Vorausgegangene Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß die Schweine Zona pellucida aus 5 Glykoproteinen mit apparenten Molekularmassen von 92 kDa (ZP1), 69 kDa (ZP2), 55 kDa (ZP3) und 23 kDa (ZP4) bestehen soll (Koyama et al., 1991; Skinner und



Dunbar, 1986). Unter reduzierenden Bedingungen konnte demonstriert werden, daß Schweine ZP1 in zwei Untereinheiten dissoziierte und zwar in ein 69 kDa Polypeptid (ZP2) und ein 23 kDa Polypeptid (ZP4). Deglykosylierung von Schweine ZP3 Protein zeigte, daß es sich bei dem 55 kDa ZP3 Protein um zwei unterschiedliche Proteine handelt. Das partiell deglykosylierte Protein ergab ein 37 kDa Protein und wurde als ZP3 $\alpha$  bezeichnet, das 32 kDa Protein wurde ZP3 $\beta$  genannt (Yurewicz et al., 1987). Insgesamt muß beachtet werden, daß die Benennung porciner ZP Proteine eher zufällig ist und im wesentlichen auf ihren apparenten Molekularmassen in der SDS-PAGE beruht.

Antiserum ZP3-6 erkannte im Immunoblot keine porcine Zona pellucida Proteine. Dieses Ergebnis läßt den Rückschluß zu, daß nach SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese das durch das Antiserum ZP3-6 erkannte Epitop nicht mehr detektiert werden kann. Diese Ergebnisse sind mit den immunhistochemischen Untersuchungen in Einklang zu bringen. AS ZP3-6 erkannte zwar natives Schweine ZP3-Protein, aber nach chemischer Modifikation des Proteins (partielle Deglykosylierung) fand keine Bindung des Antikörpers an porcine ZP3 mehr statt.

Generell erkannte Antiserum AS ZP3-5 in Schweine Zona pellucida und Zona pellucida freien Eizellen immunreaktive Banden, die im SDS Gel relativ gut fokussiert sind. Diese Tatsache könnte den Schluß zulassen, daß das Antiserum hauptsächlich nur schlecht oder nicht glykosyliertes Zona pellucida Protein erkennt. Antiserum AS ZP3-5 ist gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die eine potentielle N-glykosylierte Aminosäuresequenz (Asn-Val-Ser) im Bereich des N-Terminus des Schweine Zona pellucida 3 Proteins erkennt (Ringuette et al., 1988). Aus diesem Grund könnte angenommen werden, daß eine sterische Behinderung die Bindung von AS ZP3-5 Antikörpern an das glykosylierte Protein bedingt. Proteine mit höheren Molekularmassen, die durch das Antiserum ZP3-5 erkannt werden, könnten somit als nicht glykosylierte Vorläuferproteine erklärt werden, die im SDS-Gel schlecht dissoziieren oder Polymere von Zona pellucida Proteinen sind.

Immunoblots wurden mit Antiserum AS ZP3-5 an Schweine Zona pellucida unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. AS ZP3-5 Antikörper erkannten unter nicht reduzierenden Bedingungen eine breite immunoreaktive Doppelbande im Molekularmassenbereich von 220 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen wurde das 220 kDa Protein nicht erkannt; es zeigte sich eine schwache Reaktivität im Bereich von 70 kDa und eine starke im Bereich von 53 kDa.

Wegen des Nachweises einer kräftigen Färbung im Ooplasma nach Einsatz des Antiserums AS ZP3-5 auf Ovargewebeschnitten, wurden Immunoblots mit Proteinen von Zona pellucida freien Eizellen durchgeführt. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte sich ebenfalls im 220 kDa Molekularmassenbereich ein reaktives Protein. Unter reduzierenden Bedingungen konnten in Zona pellucida freien Eizellen die beiden Proteine im 70 und 53 kDa Bereich gezeigt werden, die schon in der Zona pellucida dargestellt wurden.

AS ZP3-5 erkennt kein gereinigtes, partiell deglykosyliertes porcines ZP3 $\beta$  Protein, aber ein 220 kDa Protein. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei dem immunreaktiven 220 kDa Polypeptid nur um nicht glykosyliertes ZP3 $\beta$  in Form eines Polymers, oder um ein weiteres porcines ZP Protein handelt, das bisher noch nicht identifiziert worden ist.

Zusammenfassend kann für Antiserum ZP3-5 festgestellt werden, daß es sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen sein Antigen im Immunoblot erkannte. Antigene Proteine wurden sowohl in Zona pellucida Präparationen als auch in Präparationen Zona pellucida freier Oozyten nachgewiesen. Diese Ergebnisse decken sich mit den immunhistochemischen Untersuchungen, in denen mit Antiserum AS ZP3-5 immunreaktives Protein in Zona pellucida wie auch im Ooplasma detektiert wurde. Bei dem in der Zona pellucida und dem im Ooplasma befindlichen Protein handelt es sich wahrscheinlich um sehr ähnliche Proteine, denn sowohl in reinen Zona pellucida Präparationen als auch in Zona pellucida freien Oozyten kam es offensichtlich unter reduzierenden Bedingungen zur Dissoziation eines Dimers in zwei Monomeren. Gereinigtes, partiell deglykosyliertes Schweine Zona pellucida Protein wurde allerdings auch von diesem Antiserum nicht erkannt. Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß das Antigen durch

Modifikationen während der Trennung und Aufreinigung von ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  so modifiziert wurde, daß für die Antikörper das Epitop nicht mehr detektierbar war.

Zur Kontrolle und zum Nachweis auch geringgradiger Mengen an Schweine Zona pellucida Proteinen wurde ein polyklonales Antiserum, AS ZPO, das gegen Schweineeizellen und somit auch gegen sämtliche Schweine Zona pellucida Proteine gerichtet ist, eingesetzt. Es zeigte sich, daß hier neben mehreren Proteinen unterschiedlicher Molekularmassen auch Proteine mit sehr ähnlichen apparenten Molekularmassen, die durch das Antiserum ZP3-5 erkannt wurden, detektiert wurden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten die AS ZPO Antikörper eine Reaktivität mit Polypeptiden unterschiedlicher Molekularmassen, einschließlich einer breiten immunoreaktiven Bande im 220 kDa Bereich. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um das gleiche 220 kDa Protein, das auch von AS ZP3-5 erkannt wurde.

Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich die größte Immunoreaktivität mit einem Protein im Bereich von 70 kDa, weiterhin eine im Bereich von 75 kDa und 53 kDa. Bei dem 70 kDa und dem 53 kDa Proteinen handelt es sich möglicherweise um die gleichen Proteine, die vom AS ZP3-5 unter reduzierenden Bedingungen dargestellt werden konnten. Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Reaktion, was durch eine unterschiedliche Affinität der Antikörper bedingt sein könnte.

Das AS ZPO zeigte auch Reaktionen mit Proteinen von Zona pellucida freien Eizellen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen reagierte das Antiserum mit verschiedenen Polypeptiden unterschiedlicher Molekularmassen, einschließlich des 220 kDa Proteins, mit dem sehr wahrscheinlich auch AS ZP3-5 Antikörper reagierten.

Unter reduzierenden Bedingungen wurden durch AS ZPO mehrere Polypeptide zwischen 53 kDa und 100 kDa erkannt. Wahrscheinlich stellen das 53 kDa und das 70 kDa Polypeptid hier die gleichen Antigene dar, die auch durch AS ZP3-5 detektiert wurden.

Im Gegensatz zu AS ZP3-5 Antikörpern reagierte Antiserum AS ZPO mit gereinigtem Schweine ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$ . Beide Proteine wurden mittels partieller Deglykosylierung von

einer 53 kDa Proteinbande abgeleitet und biochemisch aufgetrennt; sie haben eine Molekularmasse von etwa 40 kDa.

Inzwischen konnten die porcine cDNA des ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$  identifiziert werden (Harris et al., 1994). Hierbei zeigte sich, daß das ZP3 $\alpha$  homologe Sequenzen mit dem Maus ZP1 Protein aufweist und daß das ZP3 $\beta$  Protein betreffend der Aminosäuresequenz ähnlich dem Maus ZP3 Protein ist. In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß Antiseren gegen gereinigtes porcines Zona pellucida 3 Protein auch mit Zona pellucida Proteinen in anderen Spezies kreuzreagieren und auch ein kontrazeptives Potential beinhalten (Millar et al., 1992; Yurewicz et al., 1987). Weitere Untersuchungen wiesen nach, daß porcine Zona pellucida 3 $\beta$  Proteine eine hohe Homologie mit dem Maus Zona pellucida 3 Protein aufwiesen (Töpfer-Petersen et al., 1993; Yurewicz et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, daß die Aminosäuresequenz des proteolytischen Schweine ZP3 $\beta$  Peptids (Aminosäure Nr. 144-150) homolog zu der Aminosäuresequenz ist, die als synthetisches Peptid als Immunogen zur Herstellung von Antiserum ZP3-5 (Aminosäuren Nr. 137-150) eingesetzt wurde (Yurewicz et al., 1992). Neben gentechnologischen Methoden konnte also auch mit immunologischen Methoden gezeigt werden, daß die Aminosäuresequenz des Schweine ZP3 $\beta$  Proteins sehr ähnlich der Aminosäuresequenz des Maus ZP3 Proteins ist.

Weder das Antiserum AS ZP3-2 noch AS ZP3-6 reagierten im Immunoblot mit antigenen Polypeptiden aus Maus Zona pellucida. Dieses Ergebnis könnte durch eine mögliche Veränderung der durch diese Antiseren detektierten Epitope bei der Probenaufarbeitung erklärt werden.

Das Antiserum AS ZP3-5 und das Kontrollantiserum AS ZPO hingegen reagierten mit Proteinbanden im Immunoblot mit Maus Zona pellucida. AS ZP3-5 erkannte Maus ZP3 Protein als eine breite, flächige und ausgezogene Bande im Molekularmassenbereich von etwa 60-90 kDa; das anti-Schweine Oozyten Antiserum AS ZPO erkannte ebenfalls dieses Protein, jedoch war die Bindung der Antikörper an die Maus Zona pellucida weniger stark.

Die hier dargestellten äußerst komplexen und komplizierten immunbiochemischen Ergebnisse können wie folgt interpretiert und zusammengefaßt werden: Antiserum ZP3-5 reagiert mit einem 220 kDa Schweine Zona pellucida Protein, das ein ähnliches oder gleiches Epitop wie

das Maus ZP3 Protein hat. Dieses Protein beinhaltet intramolekulare Disulfidbrücken, das unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht dissoziiert vorliegt. Unter reduzierenden Bedingungen kommt es zur Aufspaltung zweier Fragmente von 70 kDa und 53 kDa, die beide das Maus ZP3 Epitop beinhalten. Da das Antiserum AS ZP3-5, das gegen ein Maus Zona pellucida Protein gerichtet ist, das 220 kDa Protein erkennt, nicht aber das Schweine ZP3 $\beta$ , könnten die Ergebnisse so interpretiert werden, daß das 220 kDa Protein das dem Maus ZP3 homologe Schweine Zona pellucida Protein ist. Der Versuch, das Maus ZP3 Analogon im Immunoblot in porcinen Zona pellucida Proteinen eindeutig zu definieren, war allerdings nicht erfolgreich. Gentechnologische Methoden sind hier eindeutig den immunologischen Methoden überlegen.

Die im Rahmen der Doktorarbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß sich Antiseren gegen synthetische ZP3 Peptide zur Charakterisierung definierter Epitope unterschiedlicher ZP3 Protein Antigene eignen. In nachfolgenden Untersuchungen könnten diese Antikörper zur Identifizierung von Epitopen dienen, die eine funktionelle Relevanz für die Spermatozoen-Zona pellucida Interaktion besitzen. Es können z.B. Domänen, die für die Spermatozoenbindung von Bedeutung sind oder Bereiche des ZP3 Proteins, die für die Induktion der Akrosomreaktion von Bedeutung sind, identifiziert werden.

In parallelen Untersuchungen zu den hier beschriebenen Experimenten, die nicht im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnte gezeigt, daß Antiserum AS ZP3-6 als klinische Marker für die Integrität und Funktionalität der Zona pellucida eingesetzt werden konnte (Oehninger et al.,1996). Erste klinische Untersuchungen konnten zeigen, daß dieses Antiserum mit statistisch hochsignifikant als Marker für die Fertilisierbarkeit humaner Eizellen aus IVF-Programmen eingesetzt werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Zielstellung dieser Arbeit war die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen synthetische Peptide des Zona pellucida 3 Proteins. Aus den veröffentlichten ZP3-Aminosäuresequenzen der Maus, des Menschen und des Hamsters wurden verschiedene Teilsequenzen ausgewählt und die entsprechenden Peptide synthetisiert. Zum einen wurde eine mausspezifische Teilsequenz (ZP3-2), zum anderen zwei bei Maus, Mensch und Hamster homologe Sequenzen (ZP3-5 und ZP3-6) ausgewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei anti ZP3 Peptidantiseren charakterisiert und eingesetzt: das mausspezifische Antiserum AS ZP3-2 und die Antiseren AS ZP3-5 und AS ZP3-6, die jeweils homologe Domänen bei Maus, Mensch und Hamster darstellten. Die gewonnenen Antiseren wurden im ELISA, in der Immunhistochemie, in der Immunfluoreszenz und im Immunoblot charakterisiert.

Im ELISA konnte eine titrationsabhängige Antigenerkennung der gewonnenen Antiseren und der affinitätschromatographisch gewonnenen Antikörper nachgewiesen werden.

In der Immunhistochemie erfolgte der Einsatz der Antiseren an fixierten Ovargewebeschnitten verschiedener Spezies. Während das mausspezifische Antiserum AS ZP3-2 ausschließlich mit der Zona pellucida der Mauseizelle reagierte, detektierte das Antiserum AS ZP3-5, das gegen eine homologe ZP3 Peptidsequenz gerichtet ist, die Zona pellucida bei Maus, Ratte, Hamster, Rind und in geringem Maß auch die Zona pellucida des Menschen. Bei der Eizelle des Schweines war eine außerordentlich kräftige Reaktion im Ooplasma der Eizelle zu erkennen, während sich die Zona pellucida nur schwach anfärben ließ. Ein weiteres Antiserum, das gegen eine homologe ZP3 Aminosäuresequenz gerichtet ist, AS ZP3-6, erkannte die Zona pellucida der Mauseizelle und der menschlichen Eizelle. Das Antiserum AS ZP3-6 wurde weiterhin an humanen Hemizonae von Metaphase II Eizellen mit Spermatozoen oder ohne vorherige Bindung von Spermatozoen eingesetzt. Nach Inkubation mit dem Antiserum war an allen Hemizonae eine deutliche Immunantwort nachzuweisen. Hierbei war hinsichtlich der Bindung der Antikörper an das ZP3 Protein qualitativ und quantitativ kein Unterschied feststellbar.

Mittels der indirekten Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß die Antiseren auch natives, nicht denaturiertes Zona pellucida Protein erkennen. Antiserum AS ZP3-5 zeigte an der humanen und porcinen Zona pellucida eine kräftige Immunfluoreszenzmarkierung und eine deutlich schwächere im Zentrum der Eizelle. Im Vergleich zu AS ZP3-5 stellte Antiserum AS ZP3-6 die Zona pellucida sowohl der humanen als auch der Schweine Eizelle als eher schmalen Fluoreszenzring dar. Die qualitativen Unterschiede weisen auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit der durch die Antikörper detektierten ZP3 Epitope hin. Im Immunoblot erkannte das Antiserum AS ZP3-5 Maus Zona pellucida Protein als eine breite und ausgezogene Bande im Molekularmassenbereich von 80 kDa. Antiserum AS ZP3-5 reagierte mit einem 220 kDa Schweine Zona pellucida Protein. Unter reduzierenden Bedingungen kam es zur Aufspaltung in ein 70 kDa und 53 kDa Fragment. Nicht erkannt wurden die partiell deglykosilierten Schweine Zona pellucida Proteine ZP3 $\alpha$  und ZP3 $\beta$ . Das Antiserum AS ZP3-6 erkannte im Immunoblot keine Schweine Zona pellucida Proteine. Das gegen Schweineoozyten gerichtete Antiserum AS PO zeigte bei porcinen Zonae pellucidae und Zona pellucida freien Schweineeizellen ein ähnliches Proteinbandenmuster wie das Antiserum AS ZP3-5.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß Antikörper gegen synthetische Zona pellucida Peptide als spezifische Marker für Zona pellucida Protein eingesetzt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, durch Antiseren gegen homologe Aminosäuresequenzen des ZP3 auch ZP3 Proteine aus Spezies, deren ZP3 Aminosäuresequenz nicht bekannt ist, zu identifizieren und zu lokalisieren.

## 6 Literaturverzeichnis

**Afzalpurkar, A. and Gupta, S., K. 1997**

Identification of epitopes of monoclonal antibodies to porcine zona pellucida 3 beta glycoprotein, a homologue of the mouse/humane sperm receptor  
Am. J. Reprod. Immunol. 38 (1): 26-32

**Allison, A., C. and Hartree, E., F. 1970**

Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization  
J. Reprod. Fertil 21: 501-515

**Aonuma, S., Mayumi, T., Suzuki, K., Noguchi, T., Iwai, M. and Okabe, M. 1973**

Studies on sperm capacitation. I. The relationship between a given sperm-coating antigen and a sperm capacitation phenomenon  
J. Reprod. Fertil. 35: 425-432

**Araki, Y., Orgebin-Christ, M. C., and Tulsiani, D.R.P. 1992**

Qualitative characterization of oligosaccharide chains present on the rat zona pellucida glycoconjugates  
Biol. Reprod. 46: 912-919

**Austin, C.R. 1951**

Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg  
Aust. J. Sci. Res. (B) 4: 581-596

**Austin, C.R. 1967**

Capacitation of spermatozoa  
Int. J. Fert. 12: 25-31



**Barros, C. and Yanagimachi, R. 1972**

Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg

J. Exp. Zool. 180: 251-269

**Bercegeay, S., Allaire, F., Jean, M., L'Hermite, A., Bruyas, J.F., Renard, N., Tainturier and Barriere, P 1993**

La zone pellucide bovine: differences de composition macromoleculaire entre ovocytes, penetrees ou non a l'A 23187. et embryons

Reprod Nutr. Dev. 33: 567-576

**Barros, C. and Yanagimachi, R. 1971**

Introduction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material

Nature 233: 268-269

**Bentley, J.K.; Garbers, D.L.; Domino S.E.; Noland, T.D. and van Dop, C. 1986**

Spermatozoa contain a guanine nucleotide- binding protein ADP-ribosylated by pertussis toxin

Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 728-734

**Barany, G. and Merrieffield, R.B. 1979**

A chromatographic method for the quantitative analysis of the dithiasuccinoyl (DTS) amino-acids

Anal. Biochem. 95: 160-170

**Berger, T.M.; Davies, A.; Wardrip, N.J., and Hedrick, J.L. 1989**

Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition by solubilized components of the zona pellucida

J.Reprod. Fert. 86: 559-565

**Bielfeld, P.; Faridi, A; Zanefeld, L.J. and De-Jonge, C.J. 1994**

The zona pellucida- induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases

Fertil. Steril. 61: 536-541

**Bleil J.D., and Wassarman, P.M. 1990**

Identification of a ZP3-binding protein on acrosom-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5563-5567

**Bleil, J.D. 1991**

Sperm receptors in mammalian eggs in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton

**Bleil, J.D., Beall, C.F. and Wassarman, P.M. 1981**

Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse egg triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein ZP2

Dev. Biol. 86: 189-197

**Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. 1986**

Autoradiographic visualization of the egg's sperm receptor bound to sperm

J. Cell. Biol. 102 (4): 1363-1371

**Bleil, J.D., Greve, J.M. and Wassarman, P.M. 1988**

Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs

Dev. Biol. 128: 376-385

**Bleil, J.D. Wassarman P.M. 1980**

Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm  
Cell 20: 873-882

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1980 a**

Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6778-6782

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1980 b**

Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida  
Dev. Biol. 76: 185-202

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1983**

Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by zona pellucida glycoprotein  
Developmental Biology 95: 317-324

**Bleil, J. D., and Wasserman P. M. 1988**

Galactose at the non reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6778-6782

**Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D.G., Primakoff, P. and White, J. M. 1992**

A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion

Nature 356: 248-252

**Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B. Lee, T. and Poirier, G.R. 1992**

Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding

Biol Reprod 47: 716-722

**Bookbinder, L.H., Chen, A and Bleil, J.D. 1995**

Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein

Science 269: 86-89

**Bradford, M. M. 1976**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding

Anal Biochem. 72: 248-254

**Brucker, C., and Lipford, G.B. 1995**

The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update

Hum. Reprod: Update 1: 51-62

**Bucher, O. and Wartenberg, H. 1989**

Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 11. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern.

**Burkman, L.J., Coddington, C.C., Franken, D.R., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z. and Hodgen, G.D. 1988**

The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential  
Fertil. Steril. 49: 688-697

**Burks, D.J., Carballada, R., Moore, H.D.M. and Sailing P.M. 1995**

Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization  
Science 269: 83-86

**Chamberlain, M.E. and Dean, J. 1989**

Genomic organization of a sex specific gene: the primary sperm receptor of the mouse zona pellucida  
Dev. Biol 131: 207-214

**Chamberlain, M.E. and Dean, J. 1990**

Human homolog of the mouse sperm receptor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6014-6018

**Chang, M.C. 1951**

Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes  
Nature 168, 697-698

**Chang, M.C. 1955**

Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus  
Nature 175, 1036-1037

**Cheng, A.; Le, T.; Palacios, M.; Bookbinder, L.H.; Wasserman, P.M.; Suzuki, F. and Bleil, J.D. 1994**

Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3

J. Cell. Biol. 125: 867-878

**Choi, T.S., Mori, M., Kohomoto, K. and Shoda, Y. 1987**

Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro

J. Reprod. Fertil. 79: 565-568

**Dietl, J., Ed. 1989**

The Mammalian Egg Coat: Structure and Function

Springer Verlag KG, Berlin

**De Felici M. and Siracusa, G. 1982**

"Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture

Gam. Res. 6: 107-113

**Dostalova, Z., Calvete, J.J. and Töpfer-Peterson E. 1995**

Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface

Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (4): 237-242

**Downs, S.M., Schroeder, A.C. and Eppig, J.J. 1986**

Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing the hardening of the zona pellucida

Gam. Res. 15: 115-122

**Dulcibella, T. 1991**

Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction, in: P.M. Wassarman (ed.)  
Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991

**Dumont, J.N. and Brummett, A.R. 1985**

Egg envelopes in vertebrates  
Dev. Bio. 1: 235-288

**Dunbar, B.S., Liu, C. and Sammons, D. W. 1981**

Identification of three major proteins of porcine and rabbit zona pellucida by high resolution  
two dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell  
proteins  
Biol. Reprod. 24: 1111-1124

**Dunbar, B.S. 1983**

Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona  
pellucida, in: J.F. Hartmann (ed): Mechanism and Control of Animal Fertilization. Academic  
Press, New York

**Dunbar, B.S., Prasad, S.V., Timmons, T.M. 1991**

Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae, in B.S. Dunbar, M.G.  
O'Rand (eds): A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. Plenum Press, New  
York

**Dunbar, B.S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E. Skinner, S. and Wilkins, B. 1994**

The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression

Reprod. Fertil. Dev. 6: 331-347

**Dunbar, B.S. and Raynor, B.D. 1980**

Characterization of porcine zona pellucida antigens

Biol. Reprod 22: 941-954

**Duncan, A.E. and Fraser, L.R. 1993**

Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of a  $M_r$  95000 phosphotyrosine-containing protein

J. Reprod. Fertil 97: 287-299

**Eddy, E.M. and O'Brian, D.A. 1994**

The spermatozoon, in E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of reproduction, Second edition. Raven Press, Ltd., New York

**Endo, Y. Lee, M.A. and Kopf, G.S. 1987**

Evidence for the role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the zona pellucida-induced mouse sperm acrosome reaction

Dev. Biol. 119: 210-216

**Epifano, O. and Dean, J. 1994**

Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception

Reprod. Fertil. Dev 6: 319-330



**Eppig, J.J. 1991**

Mammalian oocyte development in vivo and in vitro, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton

**Flechon J.E., Pavlok A., Kopecny V. 1984**

Dynamics of zona pellucida formation by the mouse oocyte. An autoradiographic study  
Biol. Cell. 51: 403-406

**Florman, H.M.; Tombes, R.M; First, N.L., and Babcock, D.F. 1989**

An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G-protein-promoted elevations of internal  $\text{Ca}^{2+}$  and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis  
Dev. Biol. 135: 133-146

**Flormann, H.M.; and Wassarman P.M. 1985**

O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity  
Cell 41: 313-324

**Florman, H.M., Bechtol, K.B. and Wassarman, P.M. 1984**

Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm  
Dev. Biol. 106: 243-255

**Florman, H.M., Lemos, J.R., Arnoult, C., Oberdof, J.A. and Zeng, Y. 1995**

Exo(cyto)tic ion channels in mammalian sperm, in: P. Fènelichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Fraser, L.R. 1995**

Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Fusi, F.M., Vignali, M., Busacca, M. and Bronson, R.A. 1992**

Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes  
Mol. Reprod. Dev 31: 215-222

**Fusi, F.M., Vignali, M., Gailit, J. and Bronson, R.A. 1993**

Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD (Arg-Gly-Asp) tripeptide and express oolemmal integrins  
Mol. Reprod. Dev. 36: 212-219

**Gilman, A.G. 1987**

G-proteins: transducers of receptor-generated signals  
Annu. Rev. Biochem. 56: 615-649

**Greve, J.M., Salzmänn, G.S., Roller, R.J. and Wassarman, P.M. 1982**

Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis  
Cell 31: 749-759

**Greve, J.M. and Wassarman, P.M. 1985**

Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat  
J. Mol. Biol. 181: 253-264

**Grootenhuis, A. J., Philipsen, H. L. A., Debreetgrjinsbach, J. T. M. and van Duin, M. 1996**

Immunocytochemical localisation of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey, and human ovaries using antibodies against human ZP3  
J. Reprod. Fertil. 50 Suppl.:43-54

**Gulyas, B.J. and Schmell, E.D. 1981**

Sperm-egg recognition and binding in mammals, in: G. Jagiello, H. J. Vogel (eds.):  
Bioregulators of Reproduction. Academic Press, New York.

**Guraya, S. S. 1974**

Morphology, histochemistry and biochemistry of human oogenesis and ovulation. In:  
International Review of Cytology. Eds: G.H. Bourne and J.F. Danielli. Academic press New  
York: pp 121-151

**Gwatkin, R.B.L. 1977**

Fertilization mechanisms in man and mammals  
Plenum Press, New York

**Haidl, G. und Schill, W.B. 1990**

Andrologische Untersuchungsmethoden und Therapieprinzipien beim männlichen  
Sterilitätsfaktor  
Gynäkologie 23: 203-208

**Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C. and Sacco, A.G. 1994**

Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families  
DNA Sequence 4: 361-393

**Harrison, R.A.P. and Gadella, B.M. 1995**

Membrane changes during capacitation with special reference to lipid architecture, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Hedrick, J.L. and Wardrip N.J. 1987**

On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes  
Dev. Biol. 121: 478-488

**Henkel, R., Stalf, T. and Miska, W. 1992**

Isolation and partial characterization of the outer dense fiber proteins from human spermatozoa  
Hoppe Seylers Z. Biol. Chem. 373: 685-689

**Hinsch, K.D., Hinsch, E., Aumüller, G., Tychowiecka, I., Schultz, G. and Schill, W.B. 1992**

Immunological identification of G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in tail membranes of bovine spermatozoa  
Biol. Reprod. 47: 337-346

**Holt, W.V. 1995**

The sperm plasma membrane, in: P. Fènelichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Hokke C.H.; Damm, J.B.; Penninkhof, B., Aitken. R.J., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F. 1994**

Structure of the O-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins  
Eur. J. Biochem. 221: 491-512

**Irons, M.J. and Clermont, Y. 1982**

Formation of the outer dense fibers during spermiogenesis in the rat  
Anat. Rec. 202: 463-471

**Jaffe, L.A., Sharp, A.P. and Wolf, D.P. 1983**

Absence of an electrical polyspermy block in the mouse  
Dev. Biol. 96: 317-323

**Jones, W. R. 1994**

Gamete immunology  
Hum. Reprod. 9 Suppl. 2: 107-124

**Kanitz, W. 1994**

Biologische Grundlagen der Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind  
Züchtungskunde 66: 413-437

**Kalab, P.; Visconti, P.; Leclerc, P. and Kopf, G.S. 1994**

p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties

J. Biol. Chem. 269: 3810-3817

**Karnik, N.S., Newman, S., Kopf, G.S. and Gerton, G.L. 1992**

Developmental expression of G protein alpha subunits in mouse spermatogenic cells; evidence that alpha i is associated with the developing acrosome

Dev. Biol. 152: 393-402

**Kinloch, R.A.; Ruiz-Seiler, B. and Wassarman, P.M. 1990**

Genomic organization and polypeptid primary structure of zona pellucida glycoprotein hZP3, the hamster sperm receptor

Dev. Biol. 142: 414-421

**Kinloch, R.A.; Mortillo, S. and Wassarman, P.M. 1992**

Transgenic mouse eggs with functional hamster sperm receptors in their zona pellucida

Development 115: 937-946

**Kopf, G.S.; Woolkalis, M.J., and Gerton G.L. 1986**

Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm: Identification by islet-activating protein catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods

J. Biol. Chem. 261: 7327-7331

**Kopf, G.S.; Gerton, G.L.; Lee, M.A.; Woolkalis, M.J. and Endo, Y. 1987**

in: New Horizons in Sperm Cell Research (ed.: Mohri, H.)

Japan Scientific Societies Press: 297-308

**Kopf, G.S. and Gerton, G.L. 1991**

The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction, in: P.M. Wassarman (ed.):

Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc. Boca Raton 153-203

**Koyama, K.; Hasegawa, A, and Isoyama S. 1991**

Further characterization of the porcine zona pellucida antigen corresponding to monoclonal antibody (3A4-2G1) exclusively cross reactive with porcine and human zonae pellucidae

J. Reprod. Immunol. 19: 131-148

**Krchnak, V., Mach, O. and Maly, A. 1987**

Computer prediction of potential immunogenic determinants from protein amino acid sequence

Anal. Biochem 165: 200-207

**Laemmli, U.K. 1970**

Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 227: 680-685

**Lee, V. H. and Dunbar, B.S. 1993**

Development expression of the rabbit 55kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles

Dev. Biol. 155: 371-382

**Lee, M.A., Check, J.H. and Kopf, G.S. 1992**

A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida

Mol. Reprod. Dev. 31: 78-86

**Lee, M.A., Trucco, G.S., Bechtol, K.B., Wummer, N., Kopf, G.S, Blasco, L. and Storey, B.T. 1987**

Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay

Fertil. Steril 48: 649-658

**Leyton, L., LeGuen, P., Bunch, D. and Sailing, P.M. 1992**

Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11692-11695

**Leyton, L. Robinson, A. and Sailing, P.M. 1989**

Relationship between the M42 antigen of mouse sperm and the acrosome reaction induced by ZP3

Dev. Biol. 132: 174-178

**Leyton, L. and Sailing, P.M. 1989a**

Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction

J. Cell. Biol. 108: 2163-2168

**Leyton, L., and Sailing, P., 1989b**

95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosin kinase substrates in response to zona binding

Cell 57: 1123-1130



**Liang, L.F.; Chamow, S.M. and Dean J. 1990**

Oocyte specific expression of mouse ZP2: developmental regulation of the zona pellucida genes

Mol. Cell. Biol. 10: 1507-1515

**Liang, L.F. and Dean J. 1993**

Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes

Dev. Biol. 156: 399-408

**Lo-Leggio, L.; Williams, R.M. and Jones R. 1994**

Some effects of zona pellucida glycoproteins and sulfated polymers on the autoactivation of boar sperm proacrosin and activity of beta-acrosin

J. Reprod. Fertil. 100 (1): 177-185

**Lou, Y. H., Ang, J., Thai, H., McElveen, M. F. and Tung, K. S. K. 1995**

A zona pellucida 3 peptide vaccine induces antibodies and reversible infertility without ovarian pathology

J. Immunol. 155: 2715-2720

**Lou, Y. H., Bagavant, H., Ang, J., McElveen, M. F. Thai, H., and Tung, K. S. K. 1996**

Influence of autoimmune ovarian disease pathogenesis on ZP3 contraceptive vaccine design

J. Reprod. Fertil. 50 Suppl.: 159-163

**Lunsford, R.D., Jenkins, N.A., Kozak, C.A., Liang, L.F., Silan, C.M., Copeland, N.G. and Dean, J. 1990**

Genomic mapping of murine Zp-2 and Zp3, two oocyte-specific loci encoding zona pellucida proteins

Genomics 6: 184-187

**Maresch, G.A. and Dunbar, B.S. 1987**

Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae

J. Exp. Zool. 244: 299-307

**Mendoza, C. and Tesarik, J. 1994**

Synthetic substitutes for biological materials in human sperm-zona pellucida recognition tests.

Male factors in human infertility, Series: Frontiers in endocrinology 8: 187-205

**Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. 1981**

Ultrasensitive stain for proteins I<sup>n</sup> Polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins

Science 211: 1437-1443

**Millar, S.E.; Chamow, S.M., Baur, A.W.; Oliver, C.; Robey, F. and Dean J. 1989**

Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long term contraception in female

mice

Science 246: 935-938

**Miller, C.C., Fayrer-Hosken, R.A., Timmons, T.M., Lee, V.H., Claudle, A.B. and Dunbar, B.S. 1992**

Characterization of equine zona pellucida glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis and immunological techniques  
J. Reprod. Fertil, 96: 815-825

**Moller, C.C. and Wassarman, P.M. 1989**

Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs  
Dev. Biol. 132: 103-112

**Moore, H.D.M. 1995**

Modification of sperm membrane antigens during capacitation, in: P. Fènelichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Moore, G.D., Kopf, G.S. and Schultz, R.M. 1993**

Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor  
Dev. Biol. 159: 669-678

**Moore, K.L. 1985**

Embryologie. Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen, 2. Auflage.  
F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

**Mori, K.; Daitoh, T.; Kamada, M.; Maeda, N.; Maegawa, M.; Hirano, K.; Irahara, M. and Aono T. 1993**

Blocking of human fertilization by carbohydrates

Mol. Reprod. Dev. 36 (3): 377-381

**Morales, P. and Llanos, M. 1995**

Role of the acrosome reaction in egg vestments and plasma membrane penetration, in: P.

Fènichel, J. Parinaud (eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John

Libbey Eurotext Ltd., Montrouge

**Mortillo, S. and Wassarman, P.M. 1991**

Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments

Development 113: 141-149

**Myles, D. G., Kimmel, L. H., Blobel, C. P., White, J. M. and Primakoff, P. 1994**

Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4195-4198

**Naz, R.K. 1995**

Role of membrane tyrosine kinases in human sperm function, in: P. Fènichel, J. Parinaud

(eds.): Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext

Ltd., Montrouge

**Nichols, J. and Gardner, R.L. 1989**

Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse

Hum. Reprod. 4: 180-187

**Noguchi, S.; Hatanaka, Y.; Tobita, T, and Nakano M. 1992**

Structure analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55 kDa glycoprotein family (pZP3) from porcine zona pellucida

Eur. J. Biochem. 204: 1089-11001

**Noguchi, S., and Nakano M. 1992**

Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55 kDa glycoprotein family (pZP3) from porcine zona pellucida

Eur. J. Biochem. 209: 883-894

**Noguchi, S., and Nakano, M. 1993**

Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3

Biochim. Biophys. Acta 1158: 217-226

**Oeninger, S., Hinsch, E., Pfisterer, S., Veck, L.L., Kolm, Schill, W.B., Hodgen, G.D. and Hinsch, K.D. 1996**

Use of a specific zona pellucida (ZP) protein3 antiserum as a clinical marker for human ZP integrity and function

Fertil. Steril. 65: 139-145

**Ohzu, E. and Yanagimashi, R. 1982**

Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lyssolecithin

J.Exp. Zool. 224: 259-263

**Oliphant, G., Reynolds, A.B. and Thomas, T.S. 1985**

Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction

Am. J. Anat. 174: 269-289

**Paterson, M., Wilson, M. R., van Duin, M. and Aitken, R.J. 1996**

Evaluation of zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception

J. Reprod. Fertil. 50 Suppl.: 175-182

**Pedersen, H. 1972**

Further observations on the fine structure of the human spermatozoon

Zellforsch. 123: 305-315

**Peterson, R.N.; Campbell, P.; Hunt; W.B., and Bozzola, J.J. 1991**

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis characterization of APz, a sperm protein involved in zona binding in the pig and evidence for its binding to specific zona glycoproteins

Mol- Reprod. Dev. 28: 260-271

**Phillips. D.M. 1977**

Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa

J. Ultrastruct. Res. 58: 144-154

**Phillips, D.M. and Shalgi, R.M. 1980**

Surface properties of the zona pellucida

J. Exp. Zool. 213: 1-8

**Philpott, C.C., Ringuette, M.J. and Dean, J. 1987**

Oocyte specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida

Dev. Biol. 121: 568-575

**Piko, L. 1967**

Immunological phenomena in the reproductive process

Int. J. Fertil. 12: 377-383

**Prasad, S.V., Mujtaba, S. and Dunbar, B.S. 1995**

Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system

Biol. Reprod. 52 (2): 1167-1178

**Propping, D., Tauber, P.F. and Zaneveld, L.J.D. 1978**

Fertilization and implantation, in: H.Ludwig, P.F. Tauber (eds.): Human fertilization. Thieme, Stuttgart

**Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchettemackie, J., Drago, J., Westphal, H. and Dean, J. 1996**

Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucida and are infertile

Development 122: 2903-2910

**Reddy, R.M., Stark, R.A. and Zaneveld, J.D. 1979**

A high molecular weight antifertility factor from human seminal plasma

J. Reprod. Fertil 57: 437-446

**Ringuette, M.J.; Chamberlain, M.E.; Baur, A.W.; Sobieski, D.A.; and Dean, J. 1988**

Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida

Dev. Biol. 127: 287-295

**Roller, R.J. and Wassarman, 1983**

Role of asparagine-linked oligosaccharides in secretion of glycoproteins of the mouse egg's extracellular coat

J. Biol. Chem. 258: 13243-13249

**Rüsse, I., Sinowatz, F. 1991**

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey, Berlin/Hamburg

**Sacco, A.G.; Pierce, D.L.; Subramanian P.D.; Yurcewicz, E.D. and Dukelow, W.R. 1987**

Ovaries remain functional in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) immunized with porcine zona pellucida 55.000 macromolecule

Biol. Reprod. 36: 481-490

**Sacco, A.G.; Yurewicz, E.D.; Subramanian, M.G. and Matzat, P.D. 1989**

Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with a  $\alpha$  glycoprotein component of the  $M_r = 55.000$  family

Biol Reprod. 41: 523-32

**Sacco, A.G. and Yurewicz, E.D. 1994**

Assessment of synthetic peptides from porcine zona glycoproteins ZP3 $\alpha$  and ZP3 $\beta$  for contraceptive vaccine development, in: G. P. Talwar, K. V. S. Rao and V. S. Chauhan (eds.): Recombinant and synthetic vaccines

Narosa Publishing House, New Dehli: 283-290



**Saling, P.M. 1991**

How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies

Biol. Reprod. 44: 246-251

**Saling, P.M., Sowinski, J. and Storey, B.T. 1979**

An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucida in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction

J. Exp. Zool. (210), 353-359

**Saling, P.M., Burks, D.J. Carballada, M.R., Dowds, C.A., Leyton, L., McLeskey, S.B.****Robinson, A. and Tomes, C.N. 1995**

Sperm interaction with the zona pellucida: the role of ZRK, in: P. Fènichel, J. Parinaud (eds.):

Human sperm acrosome reaction. Colloque INSERM (236)/ John Libbey Eurotext Ltd.,

Montrouge

**Sato, K. 1979**

Polyspermy-preventing mechanisms in mouse eggs fertilized in vitro

Exp. Zool 210: 353-359

**Schroeder, A.C., Schultz, R.M., Kopf, G.S., Taylor, F.R., Becker, R.B. and Eppig, J.J.****1990**

Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2<sub>f</sub> during spontaneous

mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum

Biol. Reprod. 43: 891-897

**Shabanowitz, R.B. and O'Rand, M.G. 1988**

Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs

J. Reprod. Fertil. 82: 151-161

**Shimizu, S., Tsuji, M. and Dean, J. 1983**

In vitro synthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture

J. Biol. Chem. 258: 5858-5863

**Skinner, S.M. and Dunbar, B.S 1986**

Species variation in the zona pellucida. In: Talwar G.P. (ed.), Immunological Approaches to Contraception and Promotion of Fertility.

New York: Plenum Press: 251-268

**Stevens, R.W. III 1990**

Basic spermatozoon anatomy and physiology for the clinician, in: A.A. Acosta, R.J. Swanson, S.B. Ackerman, T.F. Kruger, J.A. van Zyl, R. Menkveld (eds.): Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Steward-Savage, J. and Bavister, B.D. 1991**

Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion

Mol. Reprod. Dev. 30: 390-395

**Thomas, T.S., Wilson, W.L., Reynolds, A.B. and Oliphant, G. 1986**

Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor

Biol. Reprod. 35: 691-703

**Takagi, J., Dobashi Araki, M.D.Y., Imai, Y., Hiroi, M., Tonosaki, A. and Sendo, F. 1989**

The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: II. Electron microscopy

Biol. Reprod. 40: 1103-1108

**Talbot, P., Summers, G.R., Hylander, B.L., Keough, E.M. and Franklin, L.E. 1976**

The role of calcium in the acrosome reaction: An analysis using ionophore A23187

J. Exp. Zool. 198: 383-392

**Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. 1979**

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:  
procedure and some applications

J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354

**Töpfer-Peterson, E.; and Calvete, J. J. 1995**

Molecular mechanisms of the interaction between sperm and the zona pellucida in mammals:  
studies on the pig

Int. J. Androl 18 Suppl. 2: 20-26

**Töpfer-Peterson, E.; Mann, K.; and Calvete, J. J. 1993**

Identification of porcine oocyte 55 kDa  $\alpha$  and  $\beta$  glycoproteins within the zona pellucida  
glycoprotein families indicates that oocyte sperm receptor activity is associated with different  
zona pellucida proteins in different mammalian species

Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 411-417

**Totzauer, I., Kolle, S., Sinowatz, F., Plendl, J., Amselgruber, W. and Töpfer-Petersen, E.  
1998**

Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3  $\alpha$ ) and ZPC (ZP3  $\beta$ ) in the bovine  
ovary during pre- and postnatal development

Anat.-Anz. 180 (1): 37-43

**Tulsiani, D.R.P., Nagdas, S.K., Cornwall, G.A. and Orgebin.Crist, M.C. 1992**

Evidence for the presence of high-mannose/hybrid oligosaccharide chains on the mouse ZP2 and ZP3

Biol. Reprod. 46: 93-100

**Urch, U.A. 1991**

Biochemistry and function of acrosin, in: P.M. Wassarman (ed.): Elements of Mammalian Fertilization, Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton

**Van Duin, M; Poleman J.E.M.; Suikerbuijk R.F.; Geurts van Kessel A.H.M. and Olijve W. 1993**

The human gene for the zona pellucida glycoprotein ZP3 and a second polymorphic locus are located on chromosome 7

Cytogenet. Cell. Genet. 63: 11-113

**Van Duin, M.; Polman, J.E.M.; Verkoelen C.C.E.H.; Bunschoten H.; Meyerink, J.H.; Olijve, W. and Aitken R.J. 1992**

Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different frequency in the Caucasian and Japanese populations

Genomics 14: 1064-1070

**Vliegenthart, J.F. 1994**

Studies on glycoprotein-derived carbohydrates

Biochem. Soc. Trans. 22: 370-373

**Ward, C.R.; Storey, B.T., and Kopf, G.S. 1992**

Activation of a G<sub>1</sub> protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix

J. Biol. Chem. 267: 14061-1467

**Ward, C.R.; Storey, B.T., and Kopf, G.S. 1994**

Selective activation of Gi1 and Gi2 in mouse sperm by zona pellucida, the egg's extracellular matrix

J. Biol. Chem. 13254-13258

**Wassarman P.M. 1988**

Zona pellucida glycoproteins

Annu. Rev. Biochem. 57: 415-442

**Wassarman P.M. 1989**

Die Besamung des Säuger-Eies

Spektrum der Wissenschaft, Februar 1989: 96-103

**Wassarman, P. M. 1990**

Profile of a mammalian sperm receptor

Development 108:1-17

**Wassarman, P.M. 1987a**

Early events in mammalian fertilization

Annu. Rev. Cell. Biol. 3: 109-142

**Wassarman, P.M. 1987b**

The biology and chemistry of fertilization

Science 235: 535-560

**Wassarman, P.M. 1992**

Regulation of mammalian fertilization by gamete adhesion molecules. In: Spermatogenesis-Fertilization-Contraception. EDS: Nieschlag E., Habenicht U.F.,

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 345-366

**Wassarman, P.M. and Albertini, D.F. 1994**

The mammalian ovum, in E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York.

**Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J. Salzmänn, G.S. and Samuels, F.G. 1985**

The mouse egg's receptor for sperm: What is it and how does it work?

Cold Spring Harb. Quant. Biol. 50: 11-19

**Weinman, D.E. and Williams, W.L. 1961**

Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa

Nature 203: 423-424

**Williams, C.J., Schultz, R.M. and Kopf, G.S. 1992**

Role of G proteins in mouse egg activation: Stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP<sub>f</sub> conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor

Dev. Biol. 151: 288-296

**Wolgemuth, D., Celenza, J. and Dunbar, B. S. 1984**

Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development

Dev. Biol. 106: 114

**Wolf, D.P. 1978**

The block to sperm penetration in zona-free mouse eggs

Dev. Biol 64: 1-10

**Yanagimachi, R. 1970**

The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation

J. Reprod. Fertil. 23:193-196

**Yanagimachi, R. 1981**

Mechanisms of fertilization in mammals, in: L. Mastroianni, J.D. Biggers (eds.): Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York

**Yanagimachi, R. (1988)**

Mammalian Fertilization

In : The Physiology of Reproduction, eds Knobil, E. and Neill, J.D.

(Raven, New York), Vol 1: 135-185

**Yanagimachi, R. (1994)**

Mammalian fertilization, in: E. Knobil, J.D. Neill (eds.): The Physiology of Reproduction, Second Edition. Raven Press, Ltd., New York

**Yurcewicz, E.C.; Hibler, D.; Fontenot, G.K. Sacco, A.G. and Harris, J. 1993**

Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 $\alpha$ , a sperm binding glycoprotein from the zona pellucida of pig oocyte

Biochim. Biophys. acta 1174: 211-214

**Yurewicz, E.C.; Sacco, A.G. and Subramanian M.G. 1987**

Structural characterization of the  $M_r = 55,000$  antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida

J- Biol Chem. 262: 564-571

**Yurewicz, E. C.; Pack, B. A. and Sacco A.G. 1992**

Porcine oocyte zona pellucida  $M_r$  55 000 glycoproteins: identification of O-glycosylated domains

Mol. Reprod. Dev. 33: 182-188

**Zhang, X., Lou, YH., Koopman, M., Doggett, T., Tung, KS. and Curtiss, R., 3<sup>rd</sup> 1997**

Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3

Biol.-Reprod. 56 (1): 33-41



## 7     **Anhang**

### Tabellarischer Lebenslauf

1. Mai 1961	in Stuttgart geboren
1968-1972	Besuch der Grundschule in Stuttgart
1972-1981	Besuch des Hölderlin-Gymnasiums in Stuttgart
1981	Allgemeine Hochschulreife
1982-1988	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1988-1989	Praktisches Jahr am Uniklinikum Gießen mit Wahlfach Dermatologie und Venerologie
24.4.1989	Ärztliche Prüfung
1989-1991	Ärztin im Praktikum in der Hautarztpraxis Dr.W. Brinkmann in Herborn
1992-1993	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der reproduktions-biochemischen Arbeitsgruppe PD Dr. Hinsch
Seit Oktober 1993	Ärztin am Zentrum für Dermatologie und Andrologie

## Danksagung

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. Hinsch für die ausgezeichnete Betreuung und die allzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung meiner Dissertationsarbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Schill, der durch die Bereitstellung von Forschungsmitteln und einem Arbeitsplatz an seiner Klinik zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen hat. Stets brachte er meiner Arbeit großes Interesse entgegen und ermöglichte es mir, meine Ergebnisse auf mehreren Kongressen zu präsentieren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Hinsch, die mich mit viel Geschick in die methodisch-wissenschaftlichen Arbeiten einwies und jederzeit für Fragen offen war.

Ich möchte auch Frau Sabine Gröger für ihre unermüdliche Unterstützung danken, die sie mir gewährte, wann immer ich sie brauchte.

Letztlich danke ich allen, die bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren.